

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C07K 14/00</b>		<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/37489</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Juni 2000 (29.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/10329 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. Dezember 1999 (22.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 59 248.5      22. Dezember 1998 (22.12.98)    DE 199 09 771.2      5. März 1999 (05.03.99)      DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: VOLLMERS, Heinz, Peter [DE/DE]; Budapeststrasse 23, D-97084 Würzburg (DE). MÜLLER-HERMELINK, Hans, Konrad [DE/DE]; Heinrich-Zeuner-Strasse 72, D-97082 Würzburg (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: SUBSTANCE FOR PRODUCING HIGHLY EFFECTIVE ANTI-TUMOUR MEDICAMENTS AND CORRESPONDING METHOD (54) Bezeichnung: SUBSTANZ ZUR GEWINNUNG HOCHWIRKSAMER TUMORARZNEIEN SOWIE VERFAHREN (57) Abstract The invention relates to a substance and a method for producing anti-tumour agents. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft eine Substanz sowie ein Verfahren zur Gewinnung von Antitumormitteln.			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Substanz zur Gewinnung hochwirksamer Tumorarzneien sowie Verfahren

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft eine Substanz sowie ein Verfahren zur Gewinnung von Antitumormitteln.

Beim Magenkarzinom handelt es sich um eine der weltweit häufigsten Krebsarten. Nach Lauren "The two histological main types of gastric carcinoma", Acta Path Microbiol Scand; 64:331-49, werden sie histologisch eingeteilt in diffuse Adenokarzinome und intestinale Adenokarzinome. Intestinale Magenkarzinome sind oft von chronischer Gastritis B begleitet und insbesondere von intestinalen Metaplasien, die als Vorläufer dysplastischer Veränderungen und von Magenkarzinomen betrachtet werden. Unterschiede zwischen diesen beiden Arten zeigen sich auch darin, daß Patienten mit Karzinomen des diffusen Typs oft der Blutgruppe A angehören, woraus auf den Einfluß genetischer Faktoren beim Krebsrisiko geschlossen werden kann, während Umweltfaktoren, z.B. eine Helicobacter pylori-Infektion, möglicherweise für die Entstehung von Karzinomen des intestinalen Typs von Bedeutung sind. Zwar ist eine abnehmende Häufigkeit der Magenadenokarzinome im Westen festzustellen, dafür treten sie aber nun vermehrt im Osten auf.

Die Therapie war bislang auf Gastrektomie und Lymphadenektomie beschränkt, aufgrund der auch dann noch schlechten Prognose besteht jedoch der Bedarf nach einer neuen begleitenden Therapie. Immunologische Studien haben gezeigt, daß auch in Fällen, in denen das Immunsystem maligne Zellen nicht wirksam bekämpfen kann. Zwar ist eine zelluläre und humorale Aktivität meßbar, aber nicht ausreichend, um die Tumorzellen zu zerstören. Ein wirkungsvoller Ansatz ist nun der, von der Immunantwort des Patienten stammende Antikörper zu isolieren, geeignet zu vermehren und

therapeutisch einzusetzen. So wurden beispielsweise von Patienten mit Lungen-, Ösophagus- und Dickdarmkrebs stammende Antikörper isoliert und davon humane monoklonale Antikörper abgeleitet, die z.B. direkt Differentiation und das Wachstum der Tumorzellen beeinflussen, welche aber zumeist  
5 das Problem der Wechselwirkung mit anderen Tumoren oder gesunden Zellen haben.

Es ist bekannt, daß humane monoklonale SC-1-Antikörper Apoptose bei Magenkarzinomzellen auslösen können (Vollmers et al., Cancer 49 (1989),  
10 2471-2476). Der Antikörper reagiert mit nahezu allen Adenokarzinomen vom diffusen Typ und etwa 20 % der Adenokarzinome vom intestinalen Typ (Vollmers et al., Cancer 76 (1995), 550-558; Vollmers et al., Cancer 79 (1997), 433-440). In klinischen Untersuchungen wurde gefunden, daß der Antikörper SC-1 in der Lage ist, eine tumorspezifische Regression und  
15 Apoptose bei primärem Magenkrebs ohne toxische Kreuzreaktivität gegenüber normalem Gewebe zu induzieren (Vollmers et al., Oncol. Rep. 5 (1998), 549-552).

Apoptose ist der programmierte Zelltod, Selbstmord von Zellen, durch  
20 Fragmentation der DNA, Zellschrumpfung und Dilatation des endoplasmatischen Reticulums, gefolgt von Zellfragmentation und der Bildung von Membranvesikeln, den sog. apoptotischen Körpern. Apoptose, die physiologische Form des Zelltods, garantiert eine schnelle und saubere Entfernung unnötiger Zellen, ohne Entzündungsvorgänge oder Gewebsver-  
25 letzungen auszulösen wie im Falle der Nekrose. Unter pathologischen Bedingungen dient sie auch zum Entfernen maligner Zellen, wie etwa Krebsvorläuferzellen. Sie kann durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden, wie etwa durch zytotoxische T-Lymphozyten oder Zytokine, wie Tumornekrosefaktor, Glukokortikoide und Antikörper. Sie ist die häufigste  
30 Todesursache eukaryontischer Zellen und kommt vor in der Embryogenese, Metamorphose und Gewebsatrophie. Apoptotische Rezeptoren an der Zelloberfläche, wie jene der NGF/TNF-Familie werden prädominant auf

Lymphozyten exprimiert, befinden sich aber auch auf verschiedenen anderen Zelltypen, weshalb sie sich nicht für eine Krebstherapie eignen. Insbesondere haben bei in-vivo-Tests Liganden und Antikörper für diese Rezeptoren zu Leberschäden geführt. Deshalb sind tumorspezifische  
5 Rezeptoren mit apoptotischer Funktion besonders wichtig.

Der zelluläre Rezeptor des monoklonalen Antikörpers SC-1 war bisher nicht bekannt. Im Rahmen der zur vorliegenden Erfindung führenden Untersuchungen konnte dieser zelluläre Rezeptor identifiziert werden. Diese  
10 Identifizierung gestaltete sich jedoch als schwierig. Einerseits reagiert der monoklonale Antikörper SC-1 bei der Westernblot-Analyse mit seinem Rezeptor nur unter ganz bestimmten Stringenzbedingungen. Andererseits findet man eine durch Denaturierungsartefakte hervorgerufene unspezifische Reaktion mit einer Reihe weiterer Proteine.

15 Bei dem zellulären Rezeptor des Antikörpers SC-1 handelt es sich um eine für Tumorzellen, insbesondere für Magenkarzinomzellen spezifische Isoform des Proteins CD55/DAF (Medof et al., J. Exp. Med. 160 (1984), 1558-1578; Caras et al., Nature 325 (1987), 545-549; Bjorge et al., Int. J.  
20 Cancer 70 (1997), 14-25), die in normalem Gewebe nicht auftritt. Die spezifischen Rezeptoreigenschaften dieser Isoform beruhen auf einer besonderen mit dem Proteinrückgrat über eine N-Verknüpfung verbundenen Glykostruktur. Der tumorspezifische Rezeptor kann in einem Screeningverfahren zur Identifizierung von spezifischen Bindepartnern eingesetzt werden.  
25 Spezifische Bindepartner an den Rezeptor sind im Sinne der vorliegenden Erfindung solche Substanzen, die selektiv an eine tumorspezifische Glykostruktur, aber nicht signifikant an eine in normalen Zellen vorkommenden Glykostrukturen von CD55/DAF binden und vorzugsweise die Fähigkeit zur Apoptoseinduzierung besitzen. Diese spezifischen Bindepartner können für  
30 die Herstellung von therapeutischen Mitteln zur Apoptoseinduzierung oder/und zur Tumorbekämpfung sowie zur Herstellung von diagnostischen Mitteln eingesetzt werden.

Die Bindung des Antikörpers SC-1 an die tumorspezifische N-verknüpfte Glykostruktur des CD55/DAF-Proteins induziert eine Tyrosinphosphorylierung von drei Proteinen und die Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-8. Weiterhin wurde gefunden, daß die durch den Antikörper SC-1 induzierte

5 Apoptose zu einer transienten Zunahme der Präsentation von tumorspezifisch N-glykosyliertem CD55/DAF an der Oberfläche von Tumorzellen führt. Diese erhöhte Präsentation kann durch eine erhöhte Expression oder/und durch eine erhöhte Glykosylierung hervorgerufen werden. Anschließend verschwindet das tumorspezifisch N-glykosylierte CD55/DAF-Protein von

10 der Zellmembran durch Endocytose. Weiterhin wird eine Spaltung von Cytokeratin 18, eine erhöhte Expression von c-myc und eine Abnahme der Expression von Topoisomerase II $\alpha$  und somit eine mindestens partielle Zellzyklusarretierung beobachtet. Die durch SC-1 induzierten apoptotischen Prozesse führen nicht zu einer erhöhten Spaltung von Poly (ADP-Ribose)-

15 Polymerase (PARP). Weiterhin findet man einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, das aus einem intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Pool freigesetzt wird. Eine Inhibierung der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung inhibiert die durch SC-1 induzierte Apoptose.

20 Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft ein Glykoprotein umfassend mindestens einen Abschnitt der Aminosäureprimärstruktur von CD55/DAF, insbesondere der membrangebundenen Isoform DAF-B und eine für Tumorzellen spezifische Glykostruktur, insbesondere eine solche Glykostruktur, die mit dem monoklonalen Antikörper SC-1 reagiert. Ein derartiges,

25 beispielsweise aus der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 (DSM ACC 201) oder aus anderen humanen Adenokarzinomzelllinien, wie 3051 (DSM ACC 270) oder 2957 (DSM ACC 240), oder aus primären Tumorzellen von Magenadenokarzinompatienten erhältliches Glykoprotein weist bei SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (unter reduzierenden Bedingungen) ein

30 scheinbares Molekulargewicht von etwa 82 kD auf. Neben diesem 82 kD Protein betrifft die Erfindung auch Varianten mit Deletionen, Insertionen oder/und Substitutionen in der Aminosäureprimärstruktur, die jedoch eine

- 5 -

dem natürlichen Protein analoge, d.h. tumorspezifische und vorzugsweise mit dem Antikörper SC-1 reaktive Glykostruktur besitzen.

Das erfindungsgemäße Glykoprotein kann erhalten werden, indem man  
5 Membranpräparationen aus Zellen, die ein Protein mit der gewünschten Glykostruktur exprimieren, z.B. aus Zellen der humanen Adenokarzinom-Zelllinie 23132 oder aus anderen humanen Adenokarzinomzelllinien herstellt und daraus das Glykoprotein durch chromatographische Verfahren z.B. durch Größenausschluß- oder/und Anionenaustauschchromatographie  
10 gewinnt. Die Herstellung der Membranpräparationen erfolgt vorzugsweise durch Lyse der Zellen in hypotonischem Puffer, Ultraschallbehandlung und anschließende Abtrennung der Zellkerne. Die Membranpräparationen können durch Zentrifugation aus dem verbleibenden Extrakt isoliert und durch chromatographische Methoden weiter aufgereinigt werden.

15 Das tumorspezifische CD55/DAF-Glykoprotein kann in einem Testverfahren eingesetzt werden, bei dem die Bindefähigkeit einer Substanz an das tumorspezifische Glykoprotein, insbesondere an dessen Glykostruktur bestimmt wird. Das Testverfahren kann als Hochdurchsatz-Screeningver-  
20 fahren automatisiert werden. Hierzu kann das Glykoprotein in isolierter Form, als Zellextrakt, insbesondere als Membranpräparation oder in Form vollständiger Zellen, insbesondere der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 oder einer anderen humanen Adenokarzinomzelllinie, oder einer mit dem CD55-Gen transformierten heterologen eukaryontischen Zelle, z.B.  
25 einer Säugierzelle, die in der Lage ist, ein Protein mit der richtigen Glykostruktur zu erzeugen, eingesetzt werden. Als Kontrolle kann die Bindung der getesteten Substanz an ein Nichttumor-CD55/DAF-Glykoprotein untersucht werden, das aus normalen humanen Zellen oder Zelllinien erhältlich ist. Substanzen, die selektiv an das tumorspezifische Glykoprotein binden, sind  
30 zur Herstellung von therapeutischen oder/und diagnostischen Mitteln geeignet.

Vorzugsweise bestimmt man weiterhin die Fähigkeit der getesteten Substanz zur Apoptoseinduzierung, insbesondere bei Tumorzellen oder/und die Fähigkeit zur Induzierung einer über CD55/DAF vermittelten Phosphorylierungskaskade. Die Induzierung der Apoptose kann durch morphologische Zelluntersuchungen, durch Apoptosetestverfahren, z.B. durch einen Adhäsionstest (Vollmers et al., Cell 40 (1985), 547-557), durch Bestimmung der Keratin 1- und DNA-Fragmentierung, oder durch Proliferationstests wie dem MTT-Proliferationstest durchgeführt werden. Alternativ kann auch eine Bestimmung von Caspase-Aktivitäten, beispielsweise von Aktivitäten von Caspase-8 und/oder Caspase-3 oder eine Bestimmung der intrazellulären freien Calciumkonzentration erfolgen. Substanzen, die selektiv eine Apoptose von Tumorzellen induzieren, können als antitumorwirksame Substanzen eingesetzt werden. Die Induzierung der Phosphorylierungskaskade kann durch Verwendung von für Phosphorgruppen, z.B. Phosphotyrosin- oder/und Phosphoseringruppen spezifischen Antikörpern verfolgt werden.

Zweckmäßigerweise werden pharmakologisch verträgliche Substanzen getestet. Hierzu zählen niedermolekulare pharmakologische Wirkstoffe, insbesondere jedoch Peptide, Peptidmimetika, Antikörper, z.B. polyklonale, monoklonale, oder rekombinante Antikörper, Antikörperfragmente oder Antikörperderivate. Weitere Beispiele für Liganden des CD55/DAF-Rezeptors sind Aptamere (NexStar Pharmaceuticals, 2860 Wilderness Place, Boulder, Colorado 80301, USA) und Spiegelmere (Noxxon Pharma, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin). Besonders bevorzugt sind beispielsweise rekombinante Antikörper wie etwa einzelkettige scFv-Antikörper, wie sie beispielsweise in Bakterienzellen wie etwa E.coli (Plückthun, Bio/Technology 9 (1991), 545-551 und darin zitierte Literaturstellen) oder auch in eukaryontischen Wirtszellen (Reff, Curr. Opinion Biotech. 4 (1993), 573-576 und Trill et al., Curr. Opinion Biotech 6 (1995), 553-560 oder darin zitierte Literaturstellen) erzeugt werden können. Weiterhin bevorzugt sind humane Antikörper, d.h. Antikörper mit humanen konstanten Domänen, wie



sie im menschlichen Körper, z.B. von Karzinompatienten, erzeugt werden, oder chimäre und humanisierte Antikörper, bei denen ursprünglich vorhandenen nichthumane konstante Domänen oder/und Frameworkregionen durch entsprechende humane Bereiche ausgetauscht wurden. Beispiele für Antikörperfragmente sind Fab-, F(ab)<sub>2</sub>- oder Fab'-Fragmente, wie sie durch proteolytische Spaltung von Antikörpern erhalten werden können. Zu den Antikörperderivaten zählen beispielsweise Konjugate von Antikörpern mit Markierungsgruppen oder/und Effektorgruppen, beispielsweise toxischen Substanzen wie etwa Choleratoxin oder Pseudomonas Exotoxin A oder radioaktiven Substanzen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, die spezifisch an das erfindungsgemäße Tumorglykoprotein CD55/DAF binden (mit Ausnahme des bereits bekannten monoklonalen Antikörpers SC-1) zur Herstellung von die Apoptose-induzierenden Mitteln oder/und zur Herstellung von Antitumormitteln oder/und zur Herstellung von Mitteln zur Tumordiagnostik. Eine tumorspezifische oder tumorselektive Bindung im Sinne der vorliegenden Anmeldung bedeutet vorzugsweise, daß eine Substanz im immunhistochemischen Nachweis mit Tumorzellen, aber nicht signifikant mit anderen Zellen reagiert. Eine Induzierung der Apoptose im Sinne der vorliegenden Anmeldung bedeutet eine Erhöhung des Apoptoseindex, d.h. der Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit der Substanz gegenüber den proliferierenden Zellen ist höher als ohne Behandlung, vorzugsweise höher als 50%. Der spontane Apoptoseindex ohne Behandlung liegt deutlich unter 10%, wobei der Nachweis von proliferierenden Zellen über das Antigen Ki67 erfolgen kann.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Bereitstellung von die Apoptose induzierenden Mitteln oder/und Antitumormitteln oder/und zur Herstellung von Mitteln zur Tumordiagnostik, wobei man eine potentiell wirksame Substanz auf ihre Fähigkeit zur spezifischen Bindung an ein erfindungsgemäßes Glykoprotein testet und bei einem positiven Test-

ergebnis die Substanz in eine für pharmazeutischen Anwendungen geeignete Darreichungsform gegebenenfalls zusammen mit üblichen Hilfs-, Zusatz- und Trägerstoffen überführt.

- 5 Geeignete pharmazeutische Darreichungsformen enthalten den Wirkstoff in einer therapeutisch wirksamen Menge, insbesondere in einer antitumorwirksamen Menge. Die einem Patienten verabreichte Dosis und die Behandlungsdauer hängen von der Art und Schwere der Erkrankung ab. Geeignete Dosierungen für die Verabreichung von Antikörpern sind beispielsweise bei
- 10 Ledermann et al. (Int. J. Cancer 47 (1991), 659-664) und Bagshawe et al. (Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4 (1991), 915-922) beschrieben.

- Der Wirkstoff kann alleine oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen
- 15 entweder gleichzeitig oder sequenziell verabreicht werden. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann neben dem Wirkstoff weitere pharmazeutisch übliche Substanzen enthalten. Die Zusammensetzung kann beispielsweise oral, nasal, pulmonal oder durch Injektion verabreicht werden. Oral verabreichbare Zusammensetzungen können in Form von Tabletten,
- 20 Kapseln, Pulvern oder Flüssigkeiten vorliegen. Durch Injektion verabreichbare Zusammensetzungen sind üblicherweise in Form einer parenteral verträglichen wässrigen Lösung oder Suspension.

- Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bekämpfung von
- 25 Tumoren, wobei man einem Patienten, insbesondere einem humanen Patienten, eine antitumorwirksame Menge einer an ein erfindungsgemäßen Glykoprotein spezifisch bindefähigen Substanz mit Ausnahme des monoklonalen Antikörpers SC-1 verabreicht.

- 30 Bindepartner für tumorspezifische CD55/DAF-Proteine können auch für diagnostische Zwecke, z.B. zum Tumorimaging, eingesetzt werden. Geeignete Methoden für das Tumorimaging sind z.B. bei Steinstraesser et

al. (Clinical Diagnosis and Laboratory Medicine 2 ((1989), 1-11) beschrieben. Hierzu werden die Bindepartner vorzugsweise in Form von Konjugaten mit Markierungsgruppen, z.B. radioaktiven oder fluoreszierenden Markierungsgruppen eingesetzt. Alternativ können die Bindepartner auch  
5 unkonjugiert mit der zu testenden Probe inkubiert und anschließend mit einem sekundären Bindungsreagenz angefärbt werden.

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Diagnose von Tumoren, wobei man eine zu testende Probe, z.B. eine Körperflüssigkeit  
10 oder eine Gewebeprobe, oder einen Patienten mit einer an ein tumorspezifisches CD55/DAF Glykoprotein bindefähigen Substanz in Kontakt bringt und das Vorhandensein, die Lokalisierung oder/und die Menge des Glykoproteins in der Probe oder im Patienten nachweist.

15 Noch ein Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, welche spezifisch das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, zum Auslösen einer Phosphorylierungskaskade. Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, welche spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, zur transienten Erhöhung der  
20 Präsentation von Tumorglykoprotein CD55/DAF an der Zelloberfläche, die durch eine erhöhte Glykosylierung oder/und Expression hervorgerufen werden kann. Anschließend verschwindet das tumorspezifische Glykoprotein von der Zelloberfläche. Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, welche selektiv an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels.  
25 Substanzen, die spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, können auch als Mittel zur Zellzyklusarretierung eingesetzt werden. Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung von Substanzen, die spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, zur Induzierung von  
30 apoptotischen Prozessen, die keine Spaltung von PARP umfassen. Die Substanzen können gegebenenfalls als Konjugate mit Markierungs- oder/und Effektorgruppen eingesetzt werden.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, die spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, insbesondere des Antikörpers SC-1 zur Induzierung von Apoptose in ruhenden Tumorzellen. Dieser Befund ist nach Kenntnisstand der Erfinder  
5 bisher noch für keine tumorselektive Substanz bekannt gewesen.

Die das tumorspezifische Glykoprotein CD55/DAF bindenden Substanzen enthalten vorzugsweise multiple, d.h. mindestens zwei Bindungsstellen für CD55/DAF. Beispielsweise können die Substanzen drei, vier, fünf, sechs,  
10 sieben, acht, neun, zehn oder mehr Bindungsstellen enthalten, so daß bei Bindung an zellständiges tumorspezifisches CD55/DAF eine Quervernetzung entsteht. Um Substanzen mit multiplen Bindungsstellen zu erhalten, können Bindemoleküle gegebenenfalls quervernetzt werden. Die Quervernetzung kann beispielsweise mittels chemischer Kopplung, z.B. über bifunktionelle  
15 Linkermoleküle, oder über hochaffine Wechselwirkungen, z.B. Streptavidin/Biotin, erfolgen. Auch wenn es sich bei dem CD55/DAF-Bindemolekül beispielsweise um Antikörper, z.B. IgG oder IgM, handelt, die bereits mehrere Bindungsstellen enthalten, kann durch Quervernetzung z.B. über Anti-IgG- oder Anti-IgM-Antikörper noch eine Verbesserung der Apoptose-  
20 induzierung erreicht werden. Die Verwendung von quervernetzten Antikörpern ist daher bevorzugt.

Die Zelllinie 23132 ist von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, unter dem Aktenzeichen DSM ACC  
25 201 erhältlich.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert. Es zeigen:

30 **Figur 1:** die Identifizierung von mit dem Antikörper SC-1 reaktiven Antigenen.

a: Aufreinigung von SC-1 Antigenen aus Membranextrakten der Magenkarzinomzelllinie 23132.

5

b: Sequenzierung eines als SC-1 Antigen identifizierten 82 kD Proteins durch Nanoelektrospray-Tandem-Massenpektroskopie.

10

Figur 2: der Einfluß einer Spaltung von GPI-Ankern durch Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) auf eine Anfärbung mit SC-1. Unbehandelte Magenkarzinomzellen der Zelllinie 23132 angefärbt mit SC-1 (a) und Anti-EMA (c); mit PI-PLC behandelte Zellen angefärbt mit SC-1 (b) und Anti-EMA (d) (400 x Vergrößerung).

15

Figur 3: das Ergebnis eines MTT Test mit dem Antikörper SC-1 bei Magenkarzinomzellen. Kontrolle: unbehandelte Zellen; SC-1: mit SC-1 behandelte Zellen; SC-1, PIPLC: mit Phospholipase und anschließend mit SC-1 behandelte Zellen.

20

Figur 4: das Ergebnis einer Analyse von mit einem CD55-Antisense-Vektor transient transfizierten Zellen. Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden, zeigen ein normales Anfärbungsmuster mit SC-1 (a) und Anti-CEA (c). In mit dem Antisense-Vektor transfizierten Zellen ist die Anfärbung mit SC-1 verringert (b), während keine Änderung bei Anfärbung mit Anti-CEA (d) zu erkennen ist.

25

30

Figur 5: das Ergebnis eines Klenow-Fragmentierungstests. Transfizierte Zellen zeigen keine Apoptose ohne Induzierung mit SC-1 (e) im Vergleich zu einer positiven Kontrolle (f). Nach Inkubation mit SC-1 zeigen die mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen Apoptose (g), während die Mehrzahl der mit dem CD55

Antisense-Vektor transfizierten Zellen resistent gegenüber Apoptose ist (h).

5      **Figur 6:**      eine quantitative Bestimmung der durch SC-1 induzierten Apoptose. Mit dem Kontroll- und dem CD-55 Antisense-Vektor transfizierte Zellen wurden mit SC-1 inkubiert und Cytospins dieser Zellen mit dem Klenow DNA Fragmentierungskit angefärbt. Die Prozentzahlen apoptotischer Zellen wurden von zwei  
10      verschiedenen Personen durch Zählung Apoptose-positiver und negativer Zellen in drei verschiedenen Feldern mit jeweils etwa 500 Zellen bestimmt.

**Figur 7:**      die Wirkung eine Deglykosilierung auf die Bindung des Antikörpers SC-1.  
15      a:      Tumorzellen mit Puffer inkubiert und mit SC-1 angefärbt;  
b:      mit N-Glykosidase und mit SC-1 inkubierte Zellen;  
c:      mit Puffer und Anti-CD55 inkubierte Zellen und  
d:      mit N-Glykosidase und Anti-CD55 inkubierte Tumorzellen.  
20

**Figur 8:**      Das Ergebnis eines MTT-Tests mit SC-1 bei der Magenkarzinom-Zelllinie 23132.  
a:      Titration von SC-1;  
25      b:      Quervernetzung von SC-1 mit Kaninchen-Anti-human IgM-Antikörpern;

**Figur 9:**      die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Induzierung der Zelllinie 23132 mit SC-1. An Punkt 1 erfolgte die Zugabe von SC-1 bzw. Kontrollantikörper. An Punkt 2 wurden die Zellen mit Ringerlösung gewaschen.  
30

Figur 10: das Expressions- und Aktivitätsmuster der Caspasen 3 und 8 nach Induzierung mit SC-1.

- 5           a:     Westernblot-Analyse der Caspasen-3 und -8. Die Aktivierung von Caspase-3 aufgrund proteolytische Spaltung ist durch Auftreten des p20 Spaltprodukts zu erkennen.
- 10          b:     das Ergebnis einer Aktivitätsbestimmung von Caspase-8. Ein vierfacher Anstieg der Caspase-8 Aktivität wurde 20 Stunden nach Induzierung der Apoptose gefunden.

Figur 11: die Phosphorylierungsmuster der Zell-Linie 23132 nach Induzierung der Apoptose.

- 15          a:     Eine rasche Phosphorylierung von Tyrosinresten in Proteinen mit Molekulargewichten von etwa 110 kD und 60 kD sowie die Dephosphorylierung eines Serinrests in einem Protein mit etwa 35 kD wurde nach Induzierung der Apoptose mit SC-1 gefunden.
- 20          b:     Eine Zunahme der Phosphorylierung eines Thyrosinrestes in einem 75 kD Protein mit einem Maximum nach 10 min wurde nach Induzierung der Apoptose gefunden.

Figur 12: eine Expressions- und Mutationsanalyse von p53.

- 25          a:     5 min nach Induzierung der Apoptose durch SC-1 wurde eine starke Zunahme der mRNA Konzentration gefunden, während die hohen p53 Proteinkonzentrationen unverändert bleiben.
- 30          b:     eine Sequenzanalyse von p53 zeigte eine Mutation in Codon 273, die zu einem Aminosäureaustausch von Arg zu His führt.

Figur 13: eine Expressionsanalyse von p21.  
Nach Induzierung der Apoptose wird eine Zunahme der p21 mRNA Konzentration gefunden.

5    Figur 14: eine Western Blot-Analyse von SC-1 induzierten Zellen.  
a:    CD55/DAF Expression (Anfärbung mit SC-1)  
b:    Spaltung von PARP (Anfärbung mit Anti-PARP-Antikörper)  
c:    Anfärbung mit Anti-Topoisomerase II $\alpha$ -Antikörper als  
10    Marker für zelluläre Proliferation  
d:    c-myc Expression (Anfärbung mit Anti-c-myc-Antikörper)

15    Figur 15: die Wirkung des Caspase-3 Inhibitors Ac-DEVD-CHO auf die SC-1-induzierte Apoptose.

20    Figur 16: den Nachweis einer tumorzellspezifischen Apoptose durch in situ Kernfärbung bewirkt durch Verabreichung des Antikörpers SC-1 an einem Primärtumor.

25    Figur 17: die Wirkung der Verabreichung des Antikörpers SC-1 auf einen Primärtumor.  
a:    Biopsieprobe vor Verabreichung von SC-1 (in situ Färbung auf Apoptose)  
b:    Primärtumor nach Verabreichung von SC-1 (in situ Färbung auf Apoptose)  
c:    Biopsie vor Verabreichung von SC-1 (histologische Regressionsanalyse)  
30    d:    Primärtumor nach Verabreichung von SC-1 (histologische Regressionsanalyse).



## Beispiele

### 1. Material und Methoden

#### 5    1.1 Zellkultur

Für alle Tests wurde die etablierte Magenadenokarzinomzelllinie 23132 (Vollmers et al., Virchows Arch. B. Zell. Pathol. Incl. Mol. Pathol. 63 (1993), 335-343) verwendet. Die Zellen wurden in RPMI-1640 mit 10%  
10    fötalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin (beide 1%) bis zur Subkonfluenz kultiviert. Für die beschriebenen Testverfahren wurden Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) vor der Anwendung gewaschen. Die humane Hybridomzelllinie SC-1 wurde wie bei Vollmers et al. (Cancer Res. 49 (1989), 2471-2476)  
15    beschrieben hergestellt und kultiviert.

#### 1.2 Aufreinigung des Antikörpers SC-1

Der humane monoklonale Antikörper SC-1 wurde aus Massenkulturen unter  
20    Verwendung von Kationenaustauschchromatographie gefolgt von Gelfiltration wie bei Vollmers et. al. (Oncology Reports 5 (1998), 35-40) beschrieben aufgereinigt.

#### 1.3 Aufreinigung des SC-1-Rezeptors

25    Zur Präparation von Membranproteinen wurden geerntete Zellen in hypotonischem Puffer (20 mM HEPES, 3 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und 5 min sonifiziert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (10.000 g, 10 min) pelletiert. Die Membranen wurden  
30    durch Zentrifugation (30 min, 100.000 g) pelletiert und in Membranlysepuffer (50 mM HEPES, pH 7,4, 0,1 mM EDTA, 1 M NaCl, 10% Glycerin und

und 1 % Triton X-100) resuspendiert. Allen Lösungen wurde Complete® Proteaseinhibitor (Boehringer Mannheim, Deutschland) zugesetzt.

Die Aufreinigung der Antigene erfolgte durch Säulenchromatographie unter Verwendung einer FPLC-Einheit (Pharmacia, Freiburg, Deutschland). Für die Größenausschlußchromatographie wurde eine Pharmacia Superdex 200 Säule (XK16/60) mit 5 mg Membranproteinpräparation in Puffer A (100 mM Tris HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 40 mM NaCl, 1 % Triton X-100) beladen. Das Säuleneluat wurde fraktioniert und in einer Westernblot-Analyse auf Reaktion mit dem Antikörper SC-1 untersucht. Positive Fraktionen wurden unter Verwendung von Puffer A auf eine MonoQ-Säule geladen. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen Gradienten unter Verwendung von Puffer B (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X100) fraktioniert und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Anfärbung mit Coomassie bzw. Westernblot-Analyse untersucht. Positive Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert.

#### 1.4 Präparation von Zell-Lysaten nach Induzierung mit SC-1

20

Die Zelllinie 23132 wurde auf 100 mm Zellkulturschalen bis zur Subkonfluenz kultiviert. Der Antkörper SC-1 wurde in einer Endkonzentration von 30 µg/ml für die jeweils angegebene Zeitdauer zugegeben. Dann wurden die Kulturplatten einmal mit PBS gewaschen und die Zellen wurden mit SDS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 mM Dithiothreitol, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin) direkt lysiert. Die Zellrückstände wurden mit einem Gummischaber gesammelt.

25

#### 1.5 Gelelektrophorese und Blots

30

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen und das Western-Blotting von Proteinen wurde unter Verwendung von

Standardprotokollen wie bei Vollmers et al. (Cancer 79 (1997), 433-440) beschrieben durchgeführt. Nitrozellulosemembranen wurden mit PBS unter Zusatz von 0,1 % Tween-20 und 2% Magermilchpulver oder 3 % Rinderse-  
rumalbumin (zur Bestimmung der Phosphorylierung) blockiert und anschlie-  
ßend eine Stunde lang mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Antikörper  
wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt. SC-1 (human) 10 µg/ml  
bzw. 15 µg/ml; Anti-Caspase-3 bzw. -8 (Ziege) (SantaCruz, Heidelberg,  
Deutschland) 5 µg/ml, Streptavidin Anti-Phosphotyrosin-Konjugat (Klon PT-  
66) 1:20.000 und Streptavidin Anti-Phosphoserin-Konjugat (Klon PSR-45)  
1:30.000 (Sigma, München, Deutschland), Maus-Anti-Topoisomerase IIα-  
Antikörper 1:1.000 (Neomarkers, Baesweiler, Deutschland), Anti-c-myc-  
Antikörper 1:1.000 (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) und Anti-PARP-  
Antikörper 1:1.000 (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland). Die Sekundär-  
antikörper Peroxidase-Kaninchen-Anti-Human-IgM-Konjugat oder Kaninchen-  
Anti-Ziegen-Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) und Peroxidase-  
konjugiertes Extravidin (Sigma) wurden mit dem SuperSignal Chemilumi-  
neszenzkit von Pierce (KMF, St. Augustin, Deutschland) nachgewiesen.

### 1.6 Proteinsequenzierung

Eine Proteinbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 82 kD wurde durch eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese isoliert und durch Anfärbung mit Coomassie sichtbar gemacht. Die p82-Bande wurde im Gel mit Trypsin (Boehringer Mannheim, nichtmodifiziert, Sequenzierungs-  
qualität) wie bei Shevchenko et al., (Anal. Chem. 68 (1996), 850-858) beschrieben gespalten. Der nicht aufgetrennte Pool von tryptischen Peptiden wurde durch Nanoelektrospray-Tandem-Massenspektrometrie wie von Wilm et al. (Nature 379 (1996), 466-469) beschrieben sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte auf einem API III Triple Quadrupol Massenspektrometer (PE Sciex, Ontario, Kanada). Die Sequenzen der Peptidfragmente wurden unter Verwendung der Tandem-Massenspektrometriedaten assembliert und durch Datenbankrecherchen den jeweiligen Proteinen zugeordnet.

### 1.7 RT-PCR

Die cDNA-Synthese aus Gesamt RNA der Tumorzellen 23132 erfolgte mit 5 µg Gesamt RNA unter Verwendung von M-MLV Reverser Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Reaktionsvolumen von 25 µl mit 1,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 pM Primer, 200 µM von jedem dNTP und 1 U Taq Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt.

Es wurden folgende PCR-Produkte erzeugt:

CD55 (640 bp Fragment aus dem Sequenzbereich von bp 382 bis 1022)  
p53-Fragment 1 (850 bp Fragment aus dem Sequenzbereich von 91 bis 940)  
p53-Fragment 2 (800 bp aus dem Sequenzbereich von 492 bis 1294)

### 1.8 Klonierungsprozeduren

Die PCR-Produkte wurden aus einem Agarosegel unter Verwendung des Jetsorb Gelextraktionskits (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) aufgereinigt. Die Klonierung der PCR-Fragmente erfolgte mit dem pCR-Script Amp SK (+) Klonierungskit (Stratagene, Heidelberg, Deutschland).

Die Klonierung des Antisense-Vektors pHOOK2-CD55-anti erfolgte durch Glätten des CD55-PCR-Produkts mit Pfu-Polymerase und Klonierung in den mit SmaI geschnittenen Expressionsvektor pHOOK2 (Invitrogen, Leek, Niederlande). Ein Klon mit Antisense Richtung der Insertion unter Kontrolle des P<sub>CMV</sub>-Promotors wurde für die Antisense-Experimente ausgewählt.

### 1.9 DNA-Sequenzierung

Acht positive Klone wurden unter Verwendung des DyeDeoxy Termination Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystems Inc., Weiterstadt, Deutschland)

sequenziert und dem automatisierten DNA Sequenzer ABIPrism 373 analysiert. Beide Stränge wurden unter Verwendung von T3 und T7 Primern sequenziert. Die Sequenzen wurden unter Verwendung der Computerprogramme DNASIS und BLAST analysiert.

5

### 1.10 Transfektion

Für Transfektionsexperimente wurden  $2-5 \times 10^7$  abgelöste Zellen in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen und in  $400 \mu\text{l}$  TBS resuspendiert.

10 Nach Zugabe von  $10 \mu\text{g}$  Plasmid DNA wurden die Zellen mit 240 V, 960 nF unter Verwendung eines Elektroporationsgeräts von BioRad (München, Deutschland) gepulst.  $5 \times 10^5$  transfizierte Zellen wurden auf einer 60 mm Zellkulturschale ausgesät und für 24 h wie zuvor beschrieben inkubiert. Die Apoptose wurde durch Zugabe von  $50 \mu\text{g/ml}$  gereinigtem SC-1 Antikörper  
15 zum Wachstumsmedium induziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und zur Herstellung von Cytospins verwendet.

### 1.11 Phospholipasetest

20 Abgelöste und deletierte Zellen wurden RPMI-1640 mit Zusätzen resuspendiert und für 90 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dieser Erholungsperiode wurden  $20 \text{ mU/ml}$  PI-PLC (Boehringer Mannheim) zugegeben, und die Zellen für weitere 60 min inkubiert. Schließlich wurden die Zellen gewaschen und zur Herstellung von Cytospins verwendet.

25

### 1.12 Glycosidase-Test

Abgelöste und gewaschene Zellen wurden in RPMI-1640 mit 10% fötalem Kälberserum resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert, dann gezählt und  
30 Cytospins hergestellt. Nach Lufttrocknung wurden die Cytospinpräparationen mit Aceton fixiert (10 min), gewaschen und mit  $20 \mu\text{U/ml}$  O-Glykosi-

dase oder 5 mU/ml N-Glycosidase (Boehringer Mannheim) für 4 h bei 37 °C inkubiert.

### 1.13 Immunhistochemische Anfärbung

5

Folgende Antikörper wurden für die immunhistochemische Anfärbung verwendet: Gereinigter Antikörper SC-1, Anti-CEA-Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) Anti-EMA-Antikörper (Loxo, Dossenheim, Deutschland) und Anti-CD55-Antikörper (Biozol, Eiching, Deutschland). Die  
10 Acetonfixierung und Anfärbung der Cytospinpräparationen erfolgte wie von Vollmers et al. (Hum. Antibodies Hybridomas 7 (1996), 37-41) beschrieben.

Zur immunhistochemischen Anfärbung von apoptotischen Zellen wurden bis zur Subkonfluenz kultivierte Zellen mit gereinigtem Antikörper SC-1  
15 (verdünnt auf 50 µg/ml) in vollständigem Wachstumsmedium für bis zu 96 h inkubiert. Adhärenz und abgelöste Zellen wurden gesammelt, zentrifugiert und in vollständigem Wachstumsmedium resuspendiert. Nach einer Zellzählung wurden Cytospin-Präparate hergestellt und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Untersuchung der Spaltung von Cytokeratin 18 in  
20 vivo wurden Biopsien von Patienten vor Behandlung mit SC-1 und Gewebeschnitte nach Behandlung und Gastrektomie wie bei Vollmers et al., (Oncol. Rep. 5 (1998), 549-552) beschrieben entnommen.

Die Cytospins wurden mit Rinderserumalbumin (15 mg/ml) in phosphatgepuffert  
25 pufferter Salzlösung (PBS) für 30 min blockiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h mit SC-1-Überstand, M30 Cyto Death-Antikörper (Roche Biochemicals, Mannheim, Deutschland) oder Maus-Anti-Cytokeratin 18 Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) 1:15 verdünnt. Anschließend wurde für 30 min in PBS gewaschen, gefolgt von einer Inkubation mit  
30 Peroxidase-markiertem Kaninchen-Anti-Maus- oder Kaninchen-Anti-Human-Konjugat (DAKO) 1:25 verdünnt. Nach 30-minütigem Waschen mit PBS erfolgte die Anfärbung mit Diaminobenzidin (0,05 %) und Wasserstoff-

peroxid (0,02 %) für 3 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt und die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

5     1.14 Apoptosetests

Cytospinpräparationen (5000 Zellen/Objektträger) wurden in Aceton fixiert und dann mit TBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit dem FragE1-Klenow DNA-Fragmentierungskit (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers angefärbt.

Ein ELISA zum Nachweis der Apoptose wurde unter Verwendung des Cell Death Detection® Kit (Roche Biochemicals) nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

15

1.15 MTT-Test

Der MTT-Proliferationstest (Carmichael et al., Cancer Res. 47 (1987), 936-942) zur Bestimmung der Apoptoseaktivität des Antikörpers SC-1 auf Magenkarzinomzellen wurde wie bei Vollmers et al. (Cancer 76 (1995), 550-558) beschrieben durchgeführt. Die Bestimmung des Zellwachstums erfolgte durch den mitochondrialen Hydroxylase-Test (Mossmann, J. Immunol. Meth. 65 (1983), 55-63). Aus der Absorption der mit SC-1 induzierten Zellen und der nicht mit SC-1 induzierten Kontrolle wurde der prozentuale Anteil von apoptotischen Zellen bestimmt (Vercammen et al., J. Exp. Med. 188 (1998), 919-930).

25

1.16 Caspase-3 und -8 Tests

Die Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-3 wurde mit dem ApoAlert™ Caspase Fluoreszenz-Testkit (Clontech, Heidelberg, Deutschland) bestimmt. Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit 40 µg/ml SC-1 für 7 bzw. 20 h inkubiert.

30

Dann wurden die Zellen gesammelt, in Zell-Lysepuffer resuspendiert und die Caspaseaktivität nach Angaben des Herstellers bestimmt.

#### 1.17 Bestimmung von intrazellulärem freien Calcium $[Ca^{2+}]$

5 Die Bestimmung der intrazellulären freien Calciumkonzentration wurde unter Verwendung des Calcium-sensitiven Farbstoffs Fura-2-AM wie von Grykiewicz et al. (J. Biol. Chem. 260 (1985), 3440-3450) beschrieben bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit einer Fura-2-AM in einer Endkonzentration von  $5 \times 10^{-6}$  M enthaltenden Ringerlösung (122,5 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,2 mM  $CaCl_2$ , 0,8 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $NaH_2PO_4$ , 5,5 mM Glucose, 10 mM HEPES pH 7,4) für 15 min inkubiert. Nach Spülen wurden die Objektträger mit einem Axiovert 100 TV Mikroskop (400-fache Vergrößerung) untersucht. Das Fluoreszenzsignal wurde bei 500 nm mit  
15 zwischen 334 und 380 nm alternierenden Anregungswellenlängen unter Verwendung einer 100-W Xenon-Lampe und einer automatischen Filterwechselvorrichtung (Zeiss, Deutschland) gemessen. Die Konzentration von intrazellulärem freiem Calcium wurde nach der Methode von Grynkiewicz et al. (supra) unter Annahme einer Dissoziationskonstante von 225 nmol/l berechnet. Die maximalen und minimalen Fluoreszenzverhältnisse ( $R_{max}$  und  $R_{min}$ ) wurden nach Zugabe von Kalibrierungslösungen gemessen.  $R_{max}$  wurde nach Zugabe einer Ringerlösung mit 3 mM  $Ca^{2+}$  und  $10^{-6}$  M Ionomycin bestimmt.  $R_{min}$  wurde in Gegenwart einer  $Ca^{2+}$  freien Ringerlösung mit 3 mM EGTA und  $10^{-6}$  M Ionomycin bestimmt.

25

#### 1.18 Inhibierung der intrazellulären Calciumfreisetzung

Zellen wurden einmal mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und für 24 h in Calcium-freiem DMEM-Medium ohne fötalem Kälberserum (FCS) gewaschen. Dann wurde aufgereinigter SC-1-Antikörper bis zu einer  
30 Endkonzentration von 40  $\mu g/ml$  zugegeben. Als Kontrolle wurden die gleichen Zellen ohne SC-1 verwendet. Die Zellen wurden in einem



befeuchteten Inkubator für weitere 24 oder 48 h inkubiert und dann mit 3 % Glutaraldehyd fixiert. Die Zellkulturplatten wurden dann mit Hilfe eines Lichtmikroskops auf morphologische Veränderungen untersucht.

## 5      2.      Ergebnisse

### 2.1 Aufreinigung des SC-1-Rezeptors CD55

Bei Westernblot-Analyse von Extrakten aus Gesamtzell-Lysaten der  
10 Magenkarzinomzelllinie 23132, die unter Niedrigsalzbedingungen (100 mM NaCl) hergestellt worden waren, reagierte der Antikörper SC-1 mit einem Protein mit einer relativen Molekularmasse von etwa 50 kD. Durch Änderung der Stringenz (1 M NaCl) und unter Verwendung von Membranpräparationen konnten weitere Proteine mit etwa 70 kD und etwa 82 kD  
15 nachgewiesen werden (Figur 1a, Spur 1). Diese Proteine wurden aus Membranfraktionen isoliert und durch sequenzielle Größenausschluß- und Anionenaustauschchromatographie gereinigt (Figur 1a, Spuren 2, 3). Die Moleküle wurden aus SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und sequenziert.

20 Das 50 kD Protein wurde als Dihydrolipoamidsuccinyltransferase (Genbank-Zugriffsnr. L37418) und das 70 kD Protein als das humane Lupus p70 Autoantigenprotein (Genbank-Zugriffsnr. J04611) identifiziert. Bei diesen Proteinen handelt es sich um zytoplasmatische bzw. nukleäre Antigene. Da  
25 der Antikörper SC-1 in immunhistochemischen Untersuchungen nur an Zelloberflächenantigene bindet, ist die Reaktivität vermutlich auf unspezifische Bindung aufgrund der Proteindenaturierung während der Westernblot-Analyse zurückzuführen.

30 Das 82 kD Protein wurde als CD55 (DAF, Genbank-Zugriffsnr. M31516, Figur 1b, Abschnitte 1 und 2) identifiziert. CD55 existiert beim Menschen in zwei genetisch bestimmten Isoformen (sekretiertes DAF-A und mem-

brangebundenes DAF-B) die durch differentielles Spleißen erzeugt werden (Caras et al., Nature 325 (1987), 545-549). Durch RT-PCR-Analyse wurde festgestellt, daß die Zelllinie 23132 nur die membranverankerte DAF-B Isoform exprimiert.

5

## 2.2 Phospholipase-Behandlung

Durch immunhistochemische Untersuchungen und im MTT-Proliferationstest wurde der Einfluß einer Abspaltung des Glykosidphosphatidylinositol (GPI)-  
10 Ankers auf die Bindung von SC-1 analysiert. Hierzu wurde der GPI-Anker durch Inkubation mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) abgespalten. Cytospins von mit PI-PLC behandelten und unbehandelten Zellen wurden immunhistochemisch mit SC-1, Anti-CD55 und Anti-EMA (Epithelialmembran-Antigen) angefärbt. Ein Vergleich mit unbehandelten  
15 Zellen (Figur 2a) zeigt einen Verlust der Anfärbungsintensität bei mit PI-PLC-behandelten und SC-1 angefärbten Zellen (Figur 2b). Bei Anfärbung mit Anti-EMA (Figur 2c, d) wurde kein Unterschied in der Anfärbung gefunden, was darauf hinweist, daß die PI-PLC-Behandlung keine Wirkung auf nicht GPI-verankerte Membranproteine hat. Beim MTT-Test führte eine Behand-  
20 lung von Zellen mit Phospholipase C zu einer signifikanten Abnahme ( $p \leq 0,05$ ) der apoptotischen Zellen (Figur 3).

## 2.3 Transfektion mit Antisense-CD55 RNA

25 Die Zelllinie 23132 wurde mit dem CD55 Antisense-Vektor pHOOK2-CD55anti und dem Kontrollvektor pHOOK2 durch Elektroporation transient transfiziert. Zuerst wurden Cytospins von transfizierten Zellen immunhistochemisch mit SC-1, Anti-CD55 und Anti-CEA (Carcino-embryonales Antigen) angefärbt. Die mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen zeigten  
30 eine intensive Anfärbung mit SC-1 und CEA (Figur 4a, c). Bei mit dem CD55 Antisense-Vektor angefärbten Zellen wurde fast keine Anfärbung mit SC-1 gefunden (Figur 4b). Die Anfärbung mit Anti-CEA-Antikörper zeigte, daß das

Expressionsmuster des (auch GPI-verankerten) CEA nicht durch die Transfektion mit dem Antisense-Vektor beeinflusst wird. Folglich wurde die Expression von CD55 spezifisch aufgrund der Expression der Antisense RNA reduziert.

5

Um zu analysieren, ob die Expression von Antisense-CD55 RNA auch die SC-1 induzierte Apoptose hemmt, wurden die Zellen einen Tag nach der Transfektion mit und ohne 30 µg/ml SC-1 für eine Dauer von 24 h inkubiert. Cytospins von mit dem Antisense-Vektor und dem Kontrollvektor transfizierten Zellen wurden mit dem FragE1 Klenow DNA Fragmentierungskit zum Nachweis einer durch Apoptose induzierten DNA-Fragmentierung angefärbt. Während mit beiden Plasmiden behandelte untransfizierte Zellen nahezu keine spontane Apoptose zeigen (Figur 5e), findet man nach Inkubation mit SC-1 eine deutliche Abnahme bei der Apoptose von mit dem CD55 Antisense-Vektor transfizierten Zellen (Figur 5g) im Vergleich zu mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen (Figur 5h).

Eine quantitative Bestimmung zeigte, daß spontane Apoptose in transfizierten 23132 Zellen mit einer Häufigkeit von 6% auftrat, während nach Inkubation mit SC-1 85% der mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen eine Apoptose zeigten. Diese apoptotische Reaktion wurde durch Transfektion mit dem CD55 Antisense-Vektor auf 21% verringert (Figur 6).

25

#### 2.4 Glykosidasebehandlung

Der Einfluß einer Proteindeglykosilierung auf die Bindung von SC-1 an die Zell-Linie 23132 wurde durch Inkubation von Cytospin-Präparaten mit O- und N-Glykosidasen vor der immunhistochemischen Anfärbung untersucht. Eine Behandlung von Zellen mit N-Glykosidase führte zu einer signifikanten Abnahme der SC-1 Anfärbung (Figur 7b), während eine Anfärbung mit Anti-CD55, der den Proteinanteil in der SCR3 Region erkennt, nicht durch Proteindeglykosilierung beeinflusst wurde (Figur 7d). Eine Inkubation mit

30

Phosphatpuffer und eine Behandlung mit O-Glycosidase hatte keine Wirkung auf die SC-1 Bindung. Dies zeigt, daß die Spezifität von SC-1 in N-verknüpften Zuckerresten und nicht in der Primärproteinsequenz lokalisiert sein muß.

5

## 2.5 Quervernetzung von CD55/SC-1

Die Zellen wurden 24 h mit zunehmenden Mengen an SC-1 inkubiert um die optimale apoptotische Aktivität von SC-1 zu bestimmen (Figur 8a). Dann erfolgte Quervernetzung bei einer Konzentration von 40 µg/ml SC-1 mit Kaninchen-Anti-Human IgM. Nach Inkubation für 48 h wurde ein 47% höherer Anteil an toten Zellen als bei mit SC-1 inkubierten Kontrollzellen gefunden (Figur 8b).

15

## 2.6 Calciumspiegel

Um zu untersuchen, ob die durch SC-1 induzierte Apoptose mit Änderungen des Calciumspiegels einhergeht, wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration der Zelllinie 23132 nach Induktion mit SC-1 und Kontrollantikörper (unspezifisches humanes IgM) bestimmt. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration etwa 1 min nach Zugabe des SC-1 Antikörpers gefunden werden, während der Kontrollantikörper keinen Einfluß hatte (Figur 9).

25

## 2.7 Caspase-Aktivität

Durch Westerblot-Analyse wurde gefunden, daß die Caspasen-3 und -8 nach Induzierung der Zelllinie 23132 mit SC-1 nach oben reguliert werden (Figur 10a). Eine die Aktivierung von Caspasen hervorrufende proteolytische Spaltung wurde für Caspase-3 durch Identifizierung des Spaltprodukts p20 nachgewiesen (Figur 10a). Bei Caspase-8 wurde ein vierfacher Anstieg der Aktivität 20 h nach der Induzierung mit SC-1 gefunden, was auf eine

30

wesentliche Beteiligung dieser Caspase beim Apoptose-Prozess hinweist (Figur 10b).

Die Zugabe des spezifischen Caspase-3-Inhibitors AC-DEVD-CHO (Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland) zeigte überraschenderweise mit steigender Konzentration eine Zunahme der Apoptose bei Bestimmung mit dem Cell Death Detection® Kit (Figur 15).

## 2.8 Proteinphosphorylierung

Das Phosphorylierungsmuster nach Induzierung der Zellen mit 40 µg/ml SC-1 Antikörper wurde durch Westernblot-Analyse von cytoplasmatischen und Membranextrakten untersucht. Dabei wurde eine frühe Tyrosinphosphorylierung von 110 kD und 60 kD Proteinen 30 bis 60 sec nach Induzierung der Apoptose gefunden (Figur 11). Das 60 kD Protein wurde nur im Cytoplasma gefunden, während das 110 kD Protein sowohl im Plasma als auch im Membranextrakt nachweisbar war. Weiterhin wurde eine langsame Tyrosinphosphorylierung eines cytoplasmatischen 75 kD Protein mit einem Maximum nach 10 min sowie das vollständige Verschwinden der Serinphosphorylierung eines 35 kD Proteins 10 min nach Induzierung gefunden.

## 2.9 Expression und Sequenzierung von p53

Um die Rolle von p53 bei SC-1 induzierter Apoptose zu untersuchen, wurde die Häufigkeit der mRNA durch RT-PCR und des Genprodukts durch Westernblot-Analyse nach Induzierung bestimmt. Dabei wurde ein deutlicher Anstieg der mRNA-Konzentration gefunden. Auf Proteinebene wurde jedoch eine konstante und nicht signifikant geänderte hohe Konzentration des p53 Genprodukts gefunden (Figur 12a).

Durch Amplifizierung von zwei p53 Fragmenten aus cDNA mit spezifischen Primern, Klonierung der PCR-Fragmente und Sequenzierung von acht Klonen

wurde die DNA-Sequenz von p53 in der Zelllinie 23132 bestimmt. Alle Klone mit das Exon 8 überspannenden Insertionen zeigten eine Mutation in Kodon 273, die zu einem Aminosäurenaustausch von Arginin zu Histidin führte (Figur 12b). Dies ist eine dominant negative Mutation, die häufig in Magenadenokarzinomen auftritt.

#### 2.10 Expression von p21

Das Protein p21 ist ein mit der Expression von p53 assoziiertes Molekül. Ein Test der Expression von p21 in der Magenkarzinomzelllinie 23132 nach Behandlung mit SC-1 ergab einen Anstieg nach 5 min gefolgt von einer Verringerung nach 60 min (Figur 13).

#### 2.11 Expression von CD55/DAF nach Induzierung der Apoptose

Es wurde das Expressionsmuster von CD55/DAF nach Induzierung der Apoptose durch 50  $\mu$ g/ml SC-1 mittels immunhistochemischer Anfärbung von Cytospin-Präparationen mit dem Antikörper SC-1 untersucht. Während nichtinduzierte Zellen eine leichte Membrananfärbung mit dem Antikörper SC-1 aufweisen, zeigten mit SC-1 induzierte Zellen eine intensive Membrananfärbung 12 h nach Induzierung der Apoptose. Dies weist auf eine Erhöhung der CD55/DAF-Präsentation an der Zelloberfläche nach Bindung der Antikörper an die Zellen hin. Diese Membrananfärbung verschwindet nach 48 h, und eine diffuse cytoplasmatische Anfärbung ist erkennbar. Diese Anfärbung wird auch nach 96 h mit verringerter Intensität gefunden. Die Zunahme der CD55/DAF-Expression wurde auch bei einer Western Blot-Analyse mit Membranextrakten von apoptotischen Zellen nach SC-1-Induzierung gefunden. Während in nichtinduzierten Zellen CD55/DAF nicht nachweisbar ist, nimmt die CD55/DAF-Expression 1 h bis 6 h nach Induzierung zu. Nach 24 h nimmt die Expression von CD55/DAF ab, ist aber immer noch höher als in nichtinduzierten Zellen (Figur 14a).

### 2.12 Spaltung von Cytokeratin 18

Der Abbau von apoptotischen Zellen geht einher mit der proteolytischen Spaltung von Cytokeratin 18. Die Spaltung von Cytokeratin 18 in der Zelllinie 23132 nach SC-1 induzierter Apoptose sowie in Primärtumoren von Patienten, die mit 20 mg SC-1 48 h vor einer Tumorresektion behandelt worden waren, wurde untersucht. Eine M30 Cyto Death-Anfärbung zeigte eine geringe Menge apoptotischer Zellen ohne Induzierung von Apoptose, während die Anzahl apoptotischer Zellen bis 96 h zunimmt.

### 2.13 Molekulare Analyse der SC-1-Apoptose

Im Einklang mit den immunhistochemischen Anfärbungen zeigte die biochemische Analyse eine Zunahme der CD55/DAF-Moleküle, gefolgt von einer leichten Abnahme nach 24 h Inkubation mit SC-1 (Figur 14a). Die Spaltung von PARP wurde durch Western Blot-Analyse unter Verwendung von Gesamtzellextrakten aus SC-1 induzierten Zellen und murinem Anti-PARP-Antikörper untersucht. In fünf unabhängigen Experimenten wurde keine Spaltung von PARP gefunden, die sich durch das Auftreten eines 85 kD Spaltungsprodukts (Lazebnik et al., Nature 371 (1994), 346-347) nachweisen lassen würde (Figur 14b).

Um Veränderungen im Zellzyklus nach Induzierung der Apoptose zu untersuchen, wurde die Expression der Topoisomerase II $\alpha$  durch Western Blot-Analyse bestimmt. Die Topoisomerase II $\alpha$  ist ein Schlüsselenzym im Zellzyklus, das bei der DNA-Replikation beteiligt ist (Watt und Hickson, Biochem. J. 303 (1994), 681-695). Die verringerte Expression der Topoisomerase II $\alpha$  nach SC-1 induzierter Apoptose zeigt daher eine Zellzyklusarretierung für mindestens einen Teil der Zellen (Figur 14c).

Der Transkriptionsfaktor c-myc ist in verschiedenen apoptotischen Prozessen beteiligt und kann durch Transfektion in Zellen eine Apoptose

induzieren (Evan et al., Cell 69 (1992), 119-128). Eine Untersuchung des Expressionsmusters von c-myc nach SC-1 induzierter Apoptose ergab eine erhöhte Expression 15 min nach Induzierung der Apoptose gefolgt von einer Abnahme nach 4 h (Figur 14d).

5

#### 2.14 Wirkung einer Verringerung der extrazellulären und intrazellulären Calciumkonzentration auf die Apoptose

Es wurde untersucht, ob  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Zellkulturmedium aufgenommen werden oder aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Reservoirs freigesetzt werden. Zur Bestimmung, ob  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Kulturmedium aufgenommen wird, wurden die Zellen für 24 h in Serum- und  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem DMEM-Medium inkubiert. Dann wurde gereinigter SC-1-Antikörper auf eine Endkonzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt und weitere 24 h inkubiert. Die Zellen wurden dann in 3 % Glutaraldehyd fixiert und in einem umgedrehten Lichtmikroskop untersucht. Verglichen mit Kontrollzellen (nicht mit SC-1 induziert) zeigten SC-1 induzierte Zellen morphologische, für eine Apoptose charakteristische Veränderungen, vergleichbar mit Zellen, die mit SC-1 in RPMI-Medium unter Zusatz von 10 % FCS inkubiert worden waren.

20

Der Einfluß von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Reservoirs wurde durch Inkubation von Zellen (kultiviert in serumfreiem DMEM-Medium) für 5 h mit 50  $\mu\text{M}$  des zellpermeablen Chelators BAPTA (Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland) untersucht. Die Zellen wurden für 24 h mit 40  $\mu\text{g/ml}$  gereinigtem SC-1 inkubiert. Es konnten keine erkennbaren Veränderungen in der Zellmorphologie beobachtet werden, was darauf hinweist, daß keine Apoptose induziert wurde. Auch durch ELISA konnte eine durch BAPTA bewirkte Hemmung der Apoptose gefunden werden.

30



### 2.15 Nachweis von Apoptose in Primärtumoren

Die Verabreichung des Antikörpers SC-1 an Magenkarzinom-Patienten führte zu einer deutlich erkennbaren tumorzellspezifischen Apoptose, wie durch in situ Kernfärbung nachgewiesen wurde (Figur 16). Während in Tumor-  
5 biopsien, die vor der Verabreichung von SC-1 entnommen wurden, keine Apoptose (Figur 17a) bzw. das Vorhandensein eines intakten Tumors ohne Regression (Figur 17c) gefunden wurde, zeigte der Primärtumor nach Verabreichung von SC-1 starke Apoptose (Figur 17b) bzw. eine starke  
10 Regression (Figur 17d).

### Patentansprüche

1. Glykoprotein umfassend mindestens einen Abschnitt der Aminosäureprimärstruktur von CD55 und eine tumorspezifische Glykostruktur.  
5
2. Glykoprotein nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Glykostruktur mit dem monoklonalen Antikörper SC-1  
10 reagiert.
3. Glykoprotein nach Anspruch 1 oder 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es bei SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein scheinbares  
15 Molekulargewicht von 82 kD aufweist.
4. Verfahren zur Gewinnung eines Glykoproteins nach einem der  
Ansprüche 1 bis 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
20 daß man Membranpräparationen aus Zellen der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 herstellt und daraus das Glykoprotein durch Größenausschluß- und/oder Anionenaustauschchromatographie gewinnt.
- 25 5. Verwendung eines Glykoproteins nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in einem Testverfahren, bei dem die Bindefähigkeit einer Substanz an das Glykoprotein bestimmt wird.
6. Verwendung nach Anspruch 5,  
30 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Bindefähigkeit an die Glykostruktur bestimmt wird.

7. Verwendung nach Anspruch 5 oder 6,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Fähigkeit der getesteten Substanz zur Apoptose-induzierung,  
insbesondere bei Tumorzellen bestimmt wird.

5

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Fähigkeit der getesteten Substanz zur Induzierung einer über  
das Glykoprotein CD55 vermittelten Phosphorylierungskaskade  
bestimmt wird.

10

9. Verwendung nach Anspruch 5 bis 8,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß das Glykoprotein in isolierter Form, als Zellextrakt, insbesondere  
als Membranpräparation oder in Form vollständiger Zellen, ins-  
besondere der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 eingesetzt  
wird.

15

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 9 zur Identifizierung  
von spezifisch an Tumorzellen bindefähige Substanzen.

20

11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Identifizierung von Mitteln zur  
Tumordiagnostik oder/und Tumorthherapie.

25

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 11,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß pharmakologisch verträgliche Substanzen getestet werden.

30

13. Verwendung nach Anspruch 12,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die getesteten Substanzen aus Peptiden, Peptidmimetika,  
Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperderivaten ausge-  
wählt werden.
14. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach  
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, mit Ausnahme des monoklona-  
len Antikörpers SC-1, zur Herstellung von die Apoptose induzierenden  
Mitteln.
15. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach  
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, mit Ausnahme des monoklona-  
len Antikörpers SC-1, zur Herstellung von Antitumormitteln.
16. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach  
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, mit Ausnahme des monoklona-  
len Antikörpers SC-1, zur Herstellung von Mitteln zur Tumordiagnos-  
tik.
17. Verfahren zur Bereitstellung von die Apoptose induzierenden Mitteln,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man eine potentiell wirksame Substanz auf ihre Fähigkeit zur  
spezifischen Bindung an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche  
1 bis 3 testet und bei einem positiven Testergebnis die Substanz in  
eine für pharmazeutische Anwendungen geeignete Darreichungsform  
gegebenenfalls zusammen mit üblichen Hilfs-, Zusatz- und Träger-  
stoffen überführt.

18. Verfahren zur Bereitstellung von Antitumormitteln,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man eine potentiell wirksame Substanz auf ihre Fähigkeit zur  
spezifischen Bindung an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche  
1 bis 3 testet und bei einem positiven Testergebnis die Substanz in  
eine für pharmazeutische Anwendungen geeignete Darreichungsform  
gegebenenfalls zusammen mit üblichen Hilfs-, Zusatz- und Träger-  
stoffen überführt.
19. Verfahren zur Bekämpfung von Tumoren,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man einem Patienten eine antitumorwirksame Menge einer an ein  
Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 spezifisch bindefähigen  
Substanz mit Ausnahme des monoklonalen Antikörpers SC-1  
verabreicht.
20. Verfahren zur Diagnose von Tumoren,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man eine zu testende Probe oder einen zu testenden Patienten  
mit einer an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3  
spezifisch bindefähigen Substanz in Kontakt bringt und das Vorhan-  
densein, die Lokalisierung oder/und die Menge des Glykoproteins in  
der Probe oder im Patienten nachweist.
21. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach  
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zum Auslösen einer Phosphory-  
lierungskaskade in Tumorzellen.
22. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach  
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zur transienten Erhöhung der  
CD55/DAF-Präsentation auf Membranen von Tumorzellen.

23. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zur Induzierung von apoptotischen Prozessen, die keine Spaltung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) umfassen.

5

24. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zum Induzieren einer Zellzyklusarretierung in Tumorzellen.

10

25. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zur Induzierung von Apoptose bei ruhenden Tumorzellen.

15

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 25,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die spezifisch bindefähige Substanz den Antikörper SC-1 umfaßt.

20

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 26,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Substanzen in Form von Konjugaten mit Markierungs- oder Effektorgruppen eingesetzt werden.

25

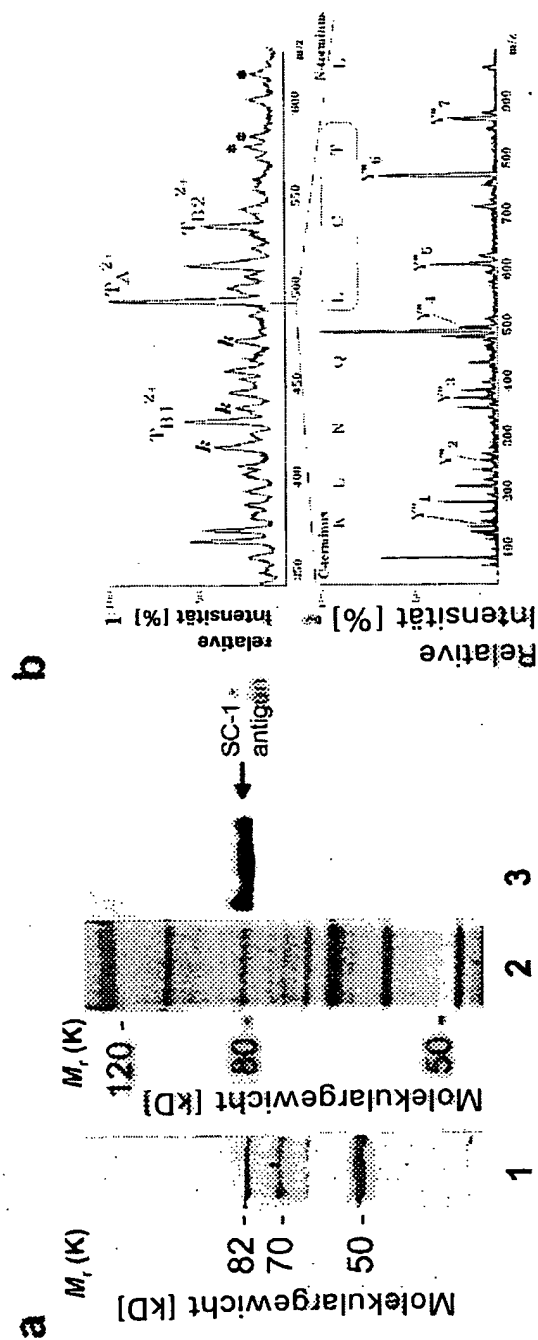
28. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 27,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Substanzen multiple Bindungsstellen für ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 aufweisen.

30

29. Verwendung nach Anspruch 28,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die spezifisch bindefähigen Substanzen quervernetzt werden.

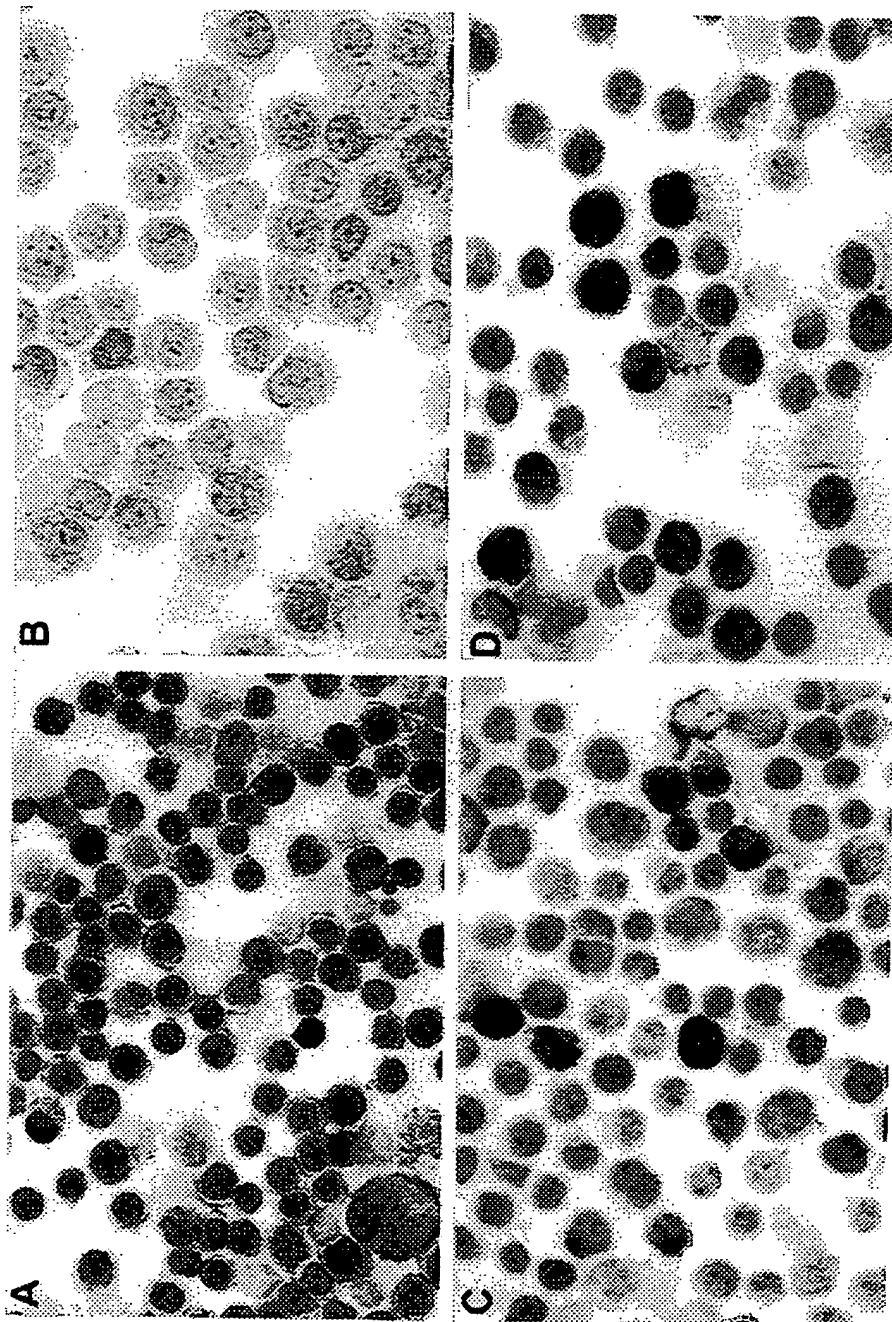
Figur 1

1/16



Figur 2

2/16

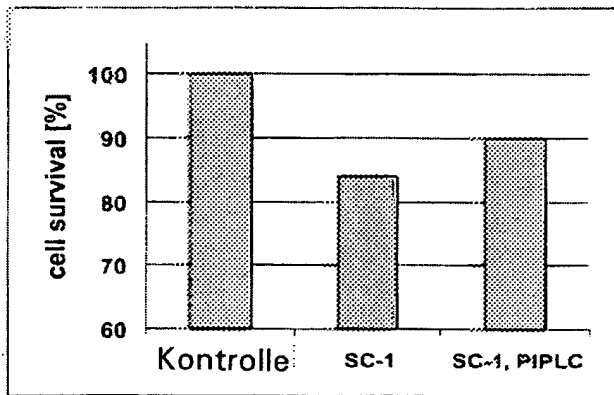




Figur 3

3/16

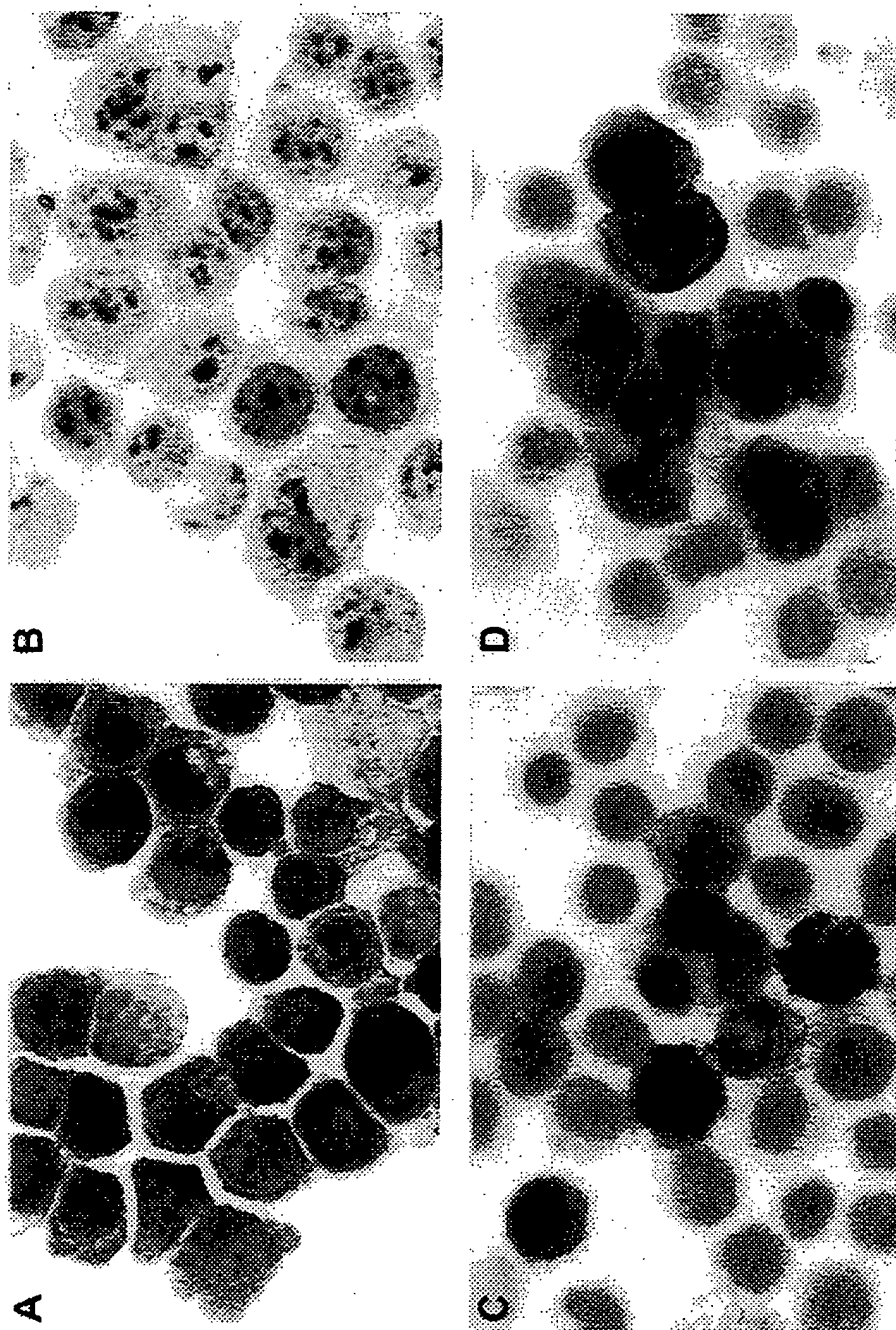
Zellüberleben [%]



Phospholipase

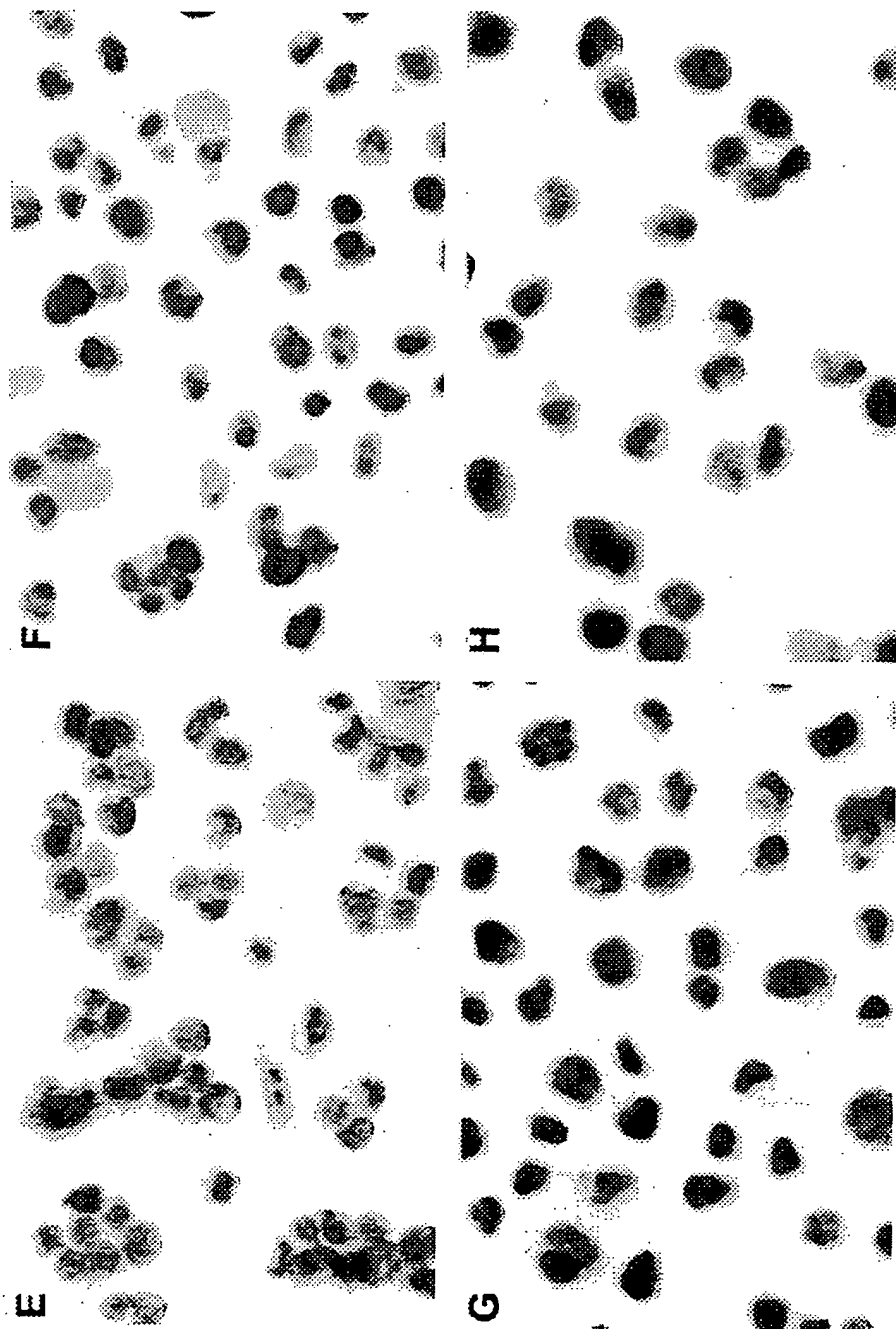
Figur 4

4/16



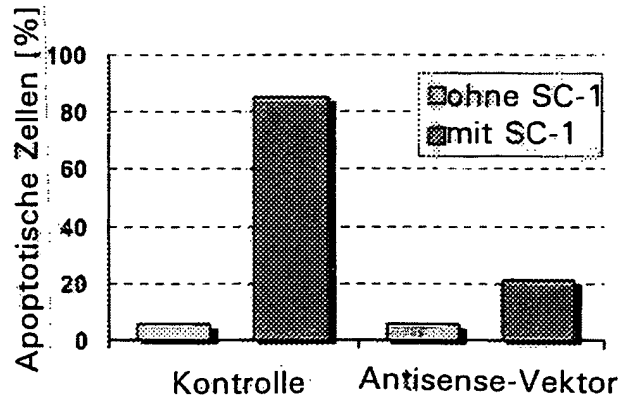
Figur 5

5/16



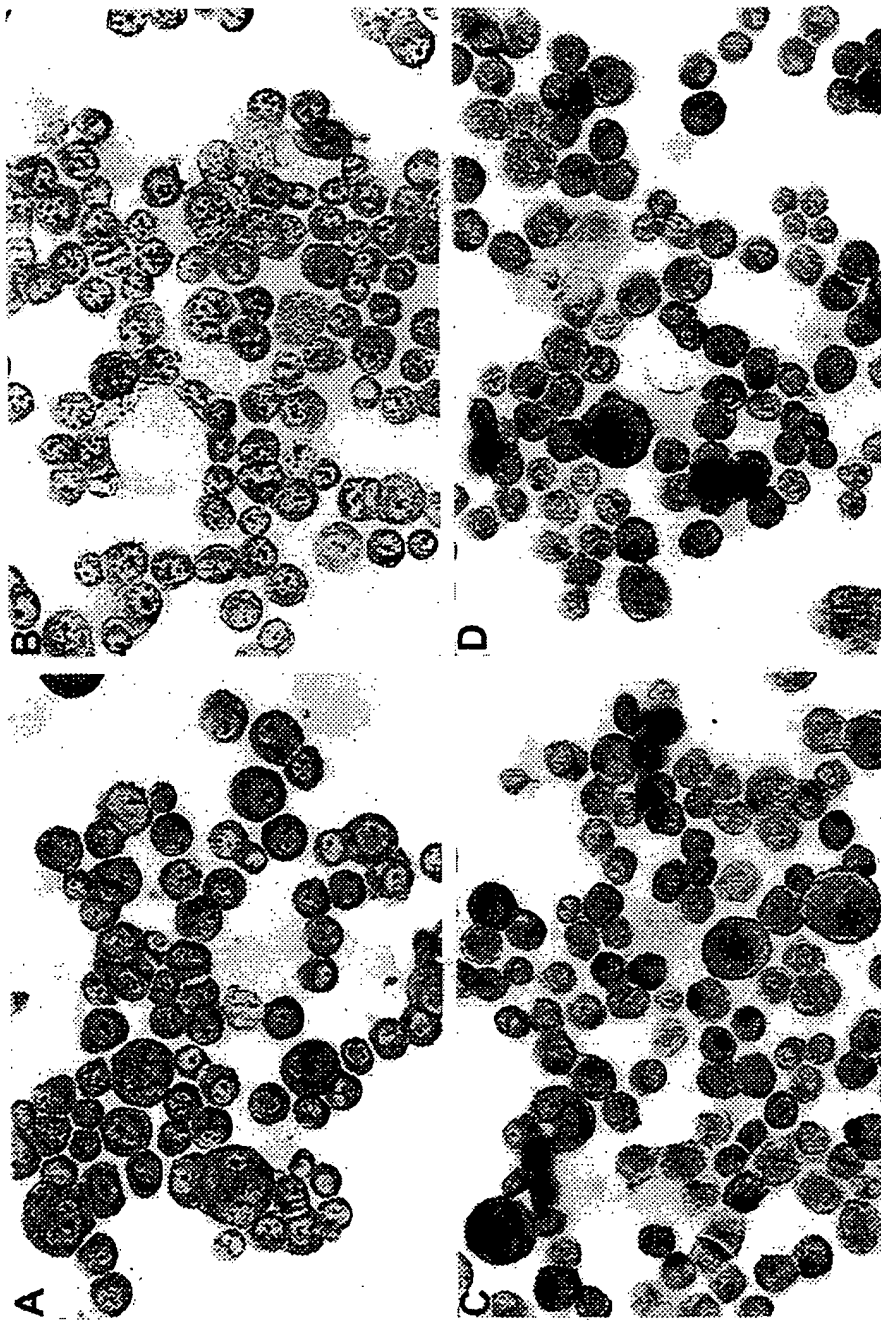
Figur 6

6/16



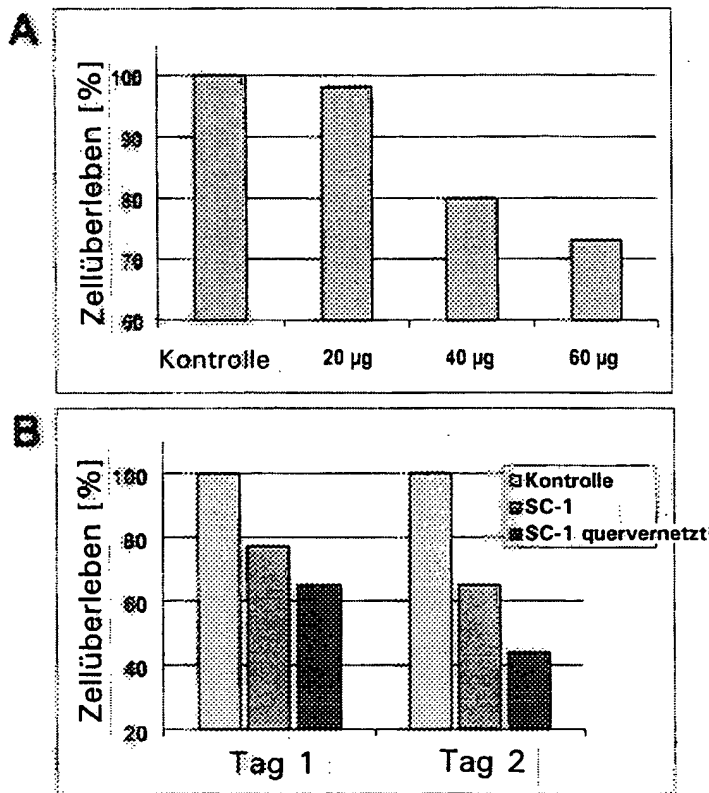
Figur 7

7/16



Figur 8

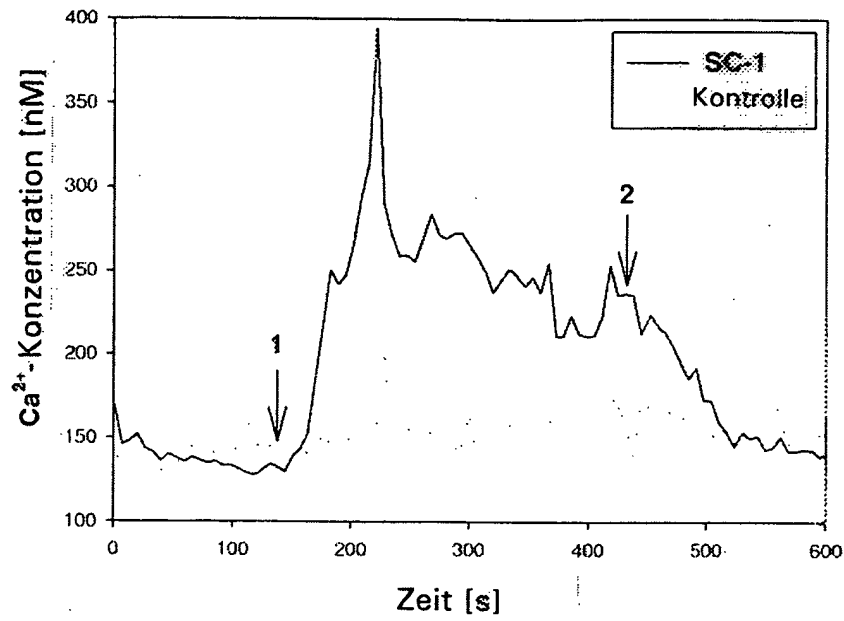
8/16

Verdünnungs-  
reihe

Quervernetzung

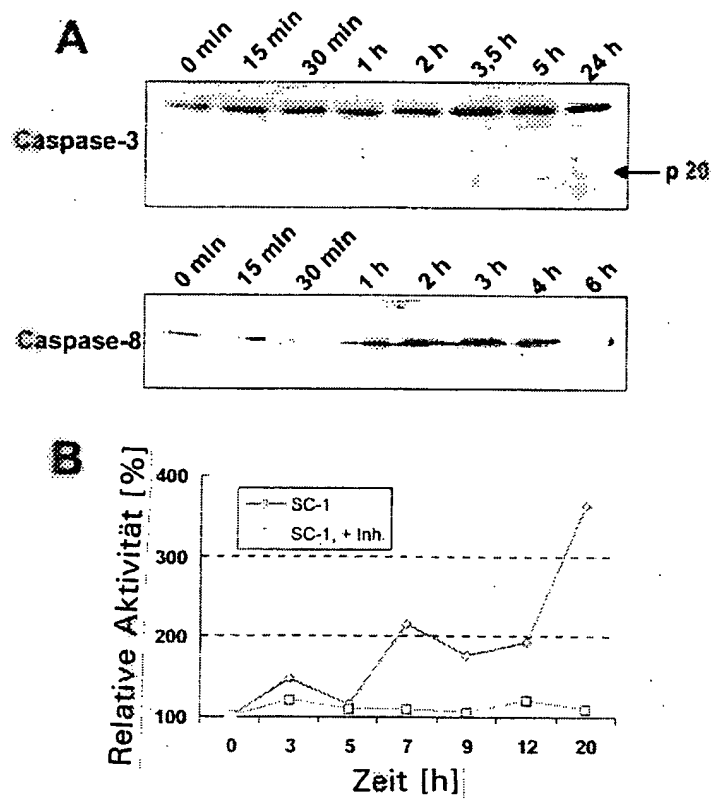
Figur 9

9/16



Figur 10

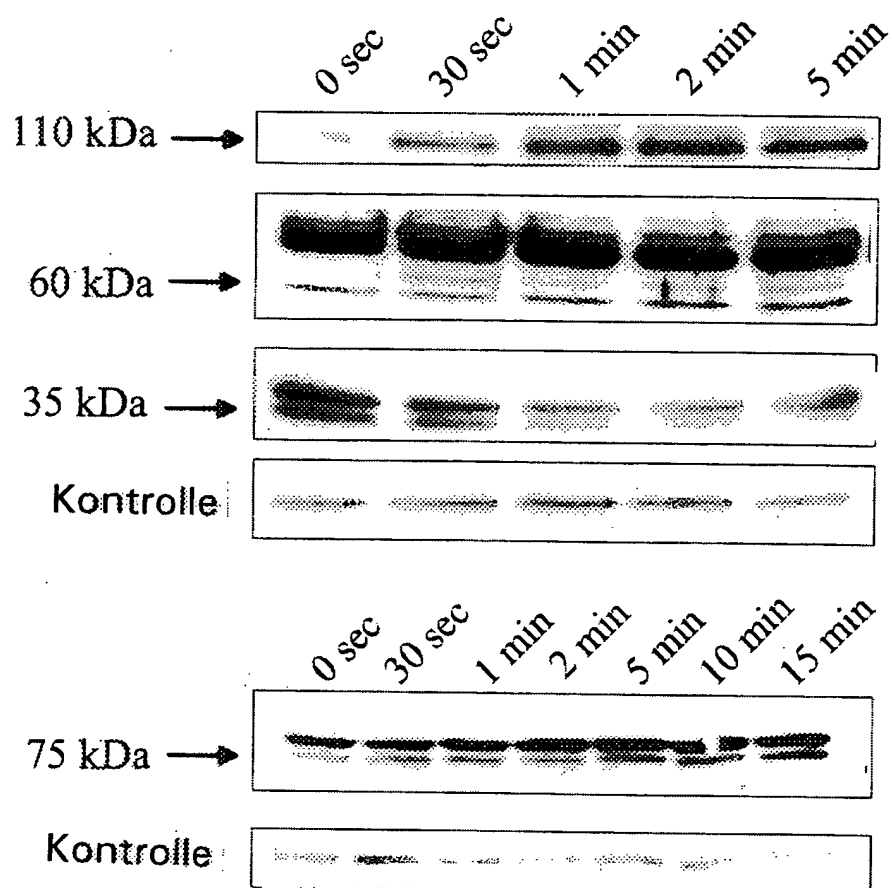
10/16





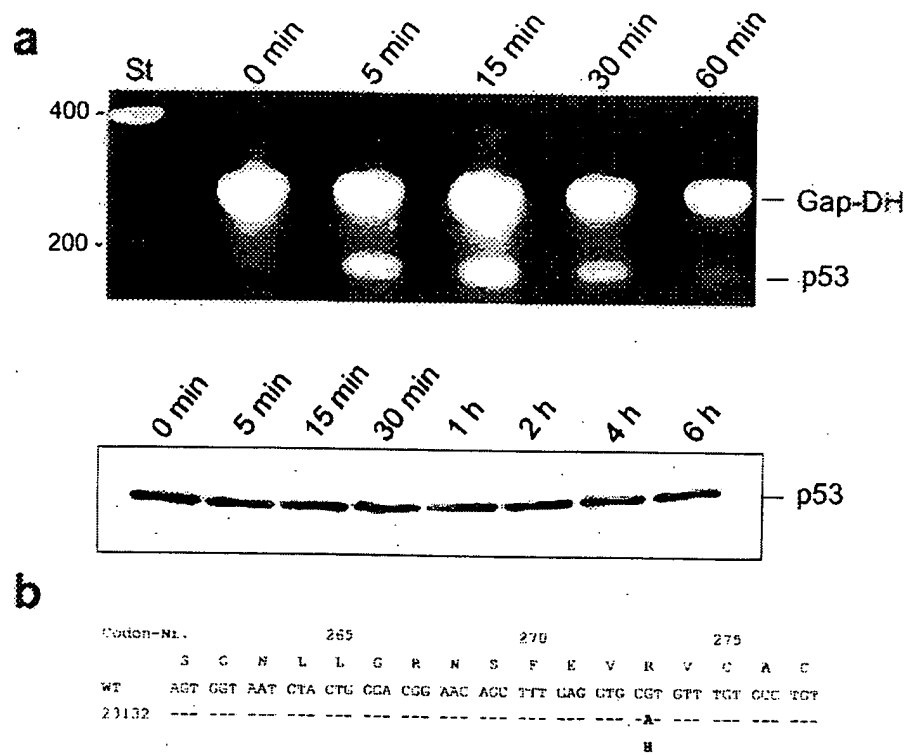
Figur 11

11/16

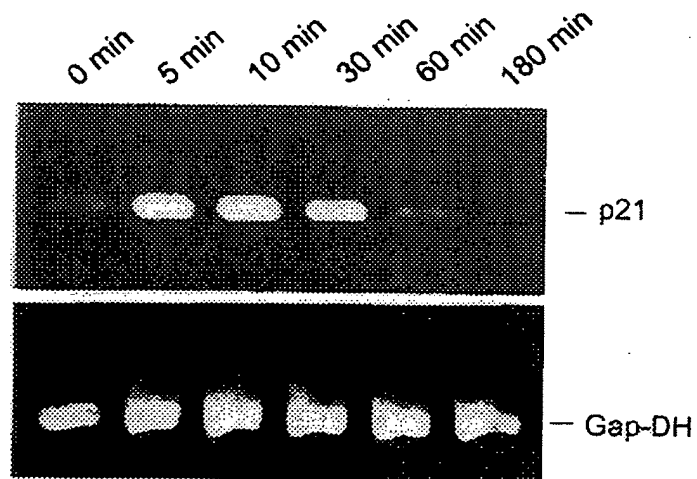


Figur 12

12/16

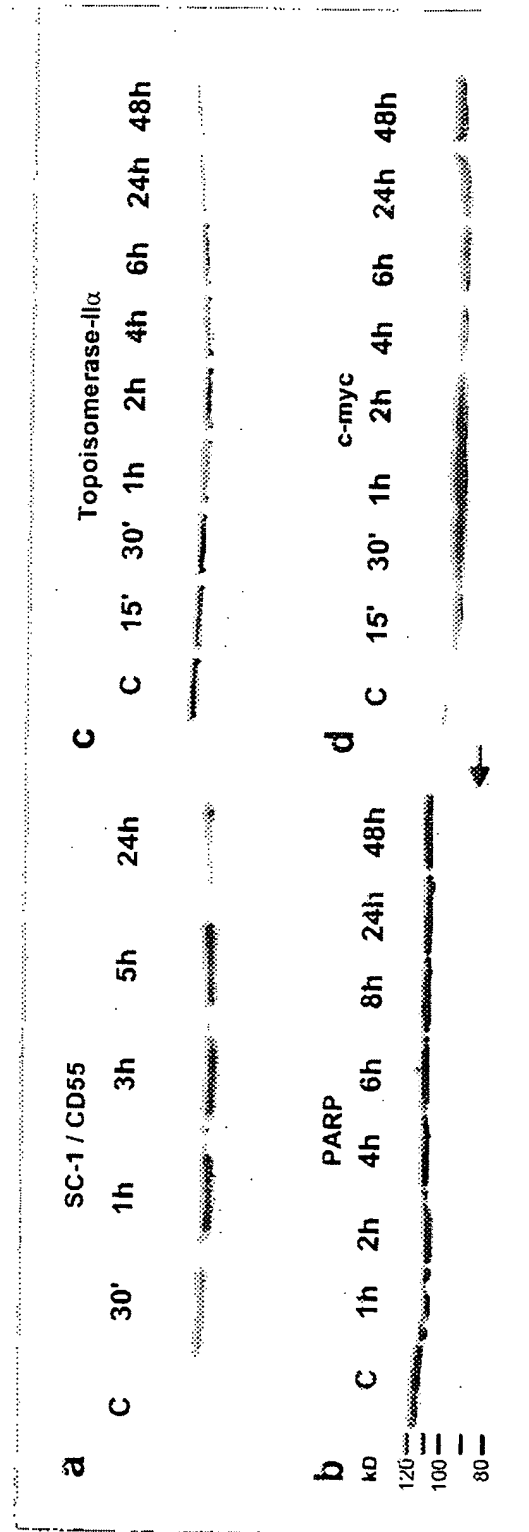


Figur 13



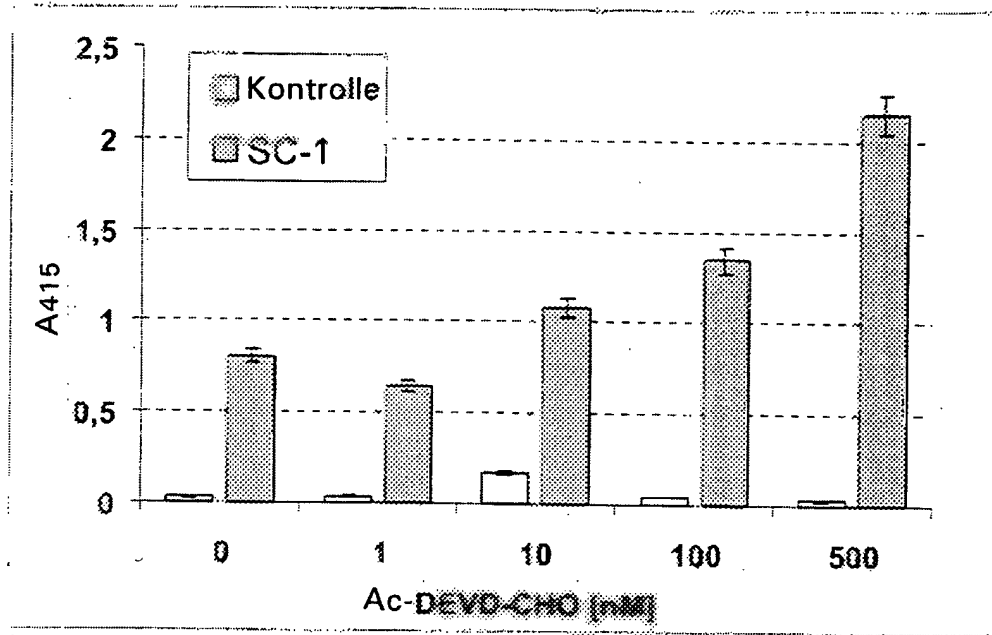
Figur 14

13/16



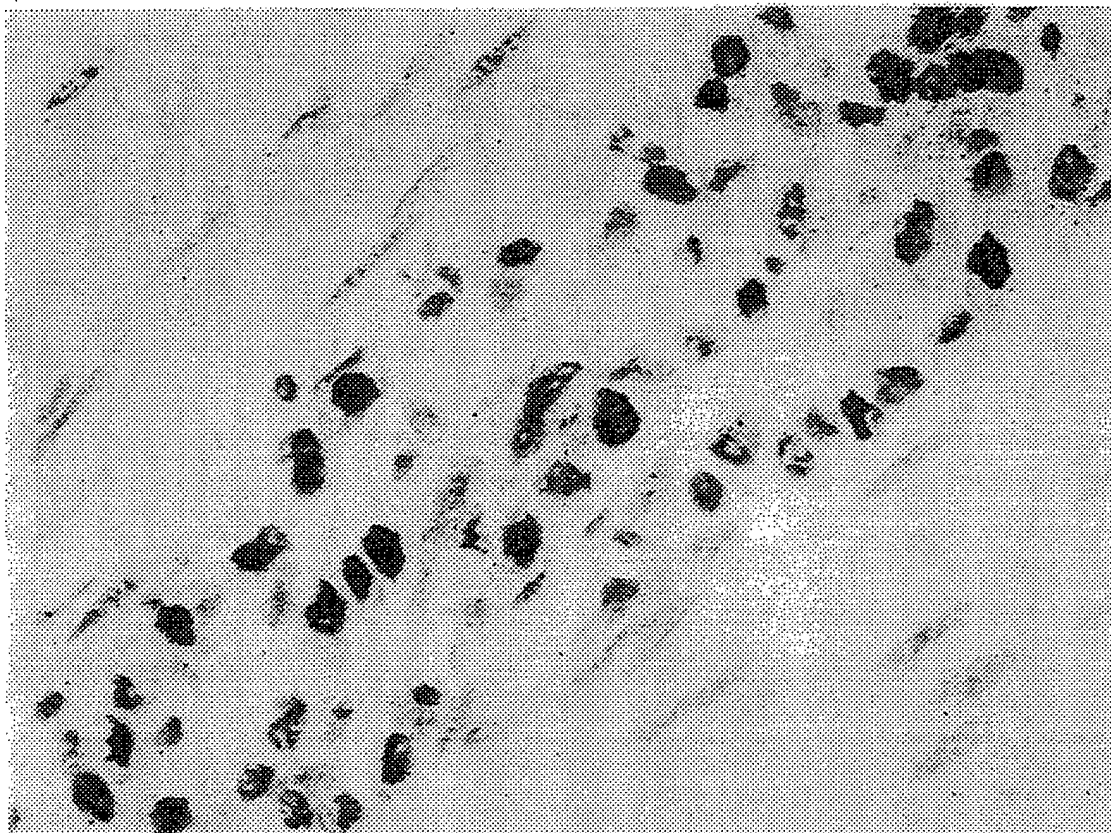
Figur 15

14/16



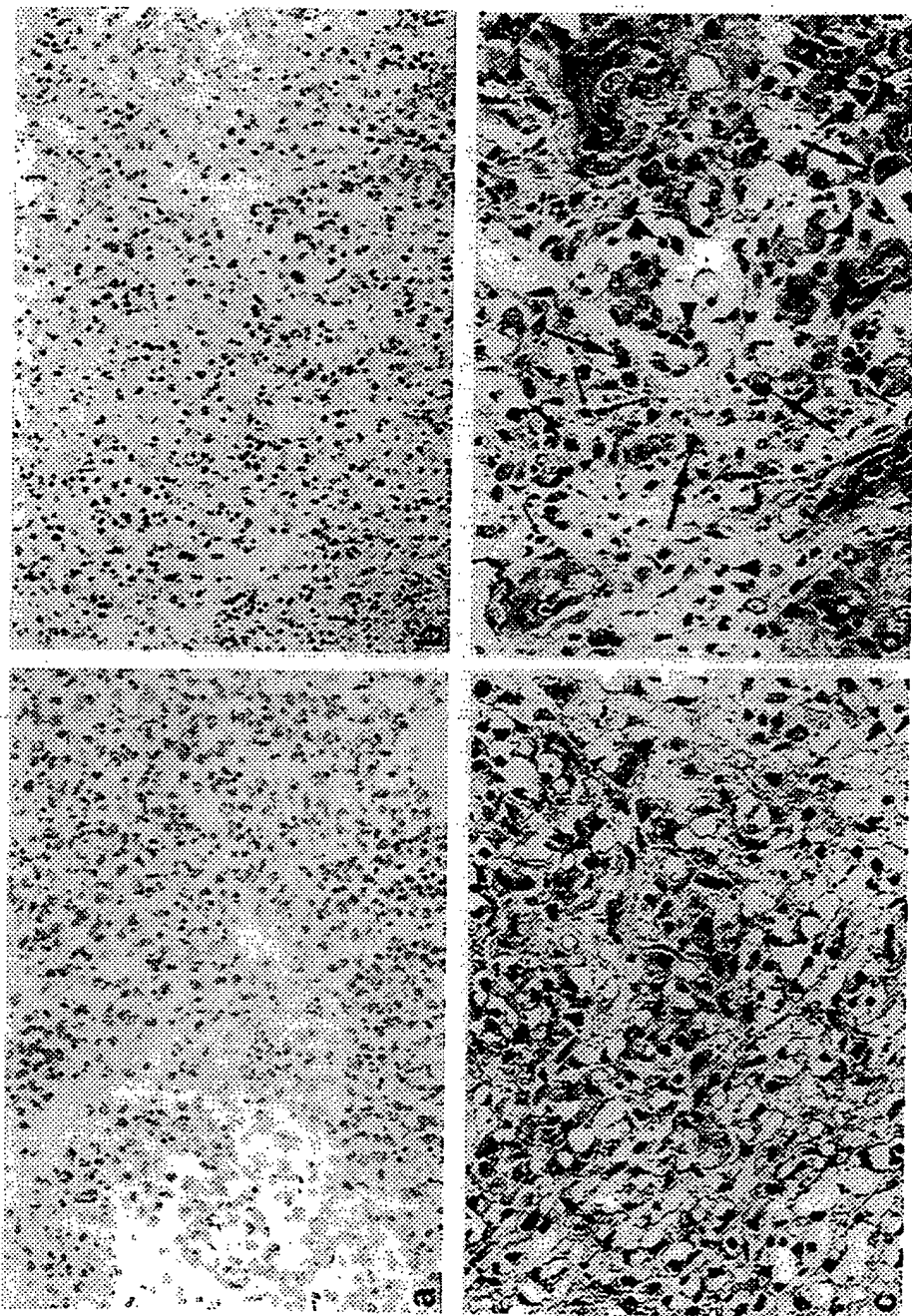
Figur 16

15/16



Figur 17

16/16



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C07K 14/705, A61K 38/17, G01N 33/68</b>		<b>A3</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/37489</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	29. Juni 2000 (29.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/10329 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. Dezember 1999 (22.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 59 248.5      22. Dezember 1998 (22.12.98)    DE 199 09 771.2      5. März 1999 (05.03.99)      DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: VOLLMERS, Heinz, Peter [DE/DE]; Budapeststrasse 23, D-97084 Würzburg (DE). MÜLLER-HERMELINK, Hans, Konrad [DE/DE]; Heinrich-Zeuner-Strasse 72, D-97082 Würzburg (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 9. November 2000 (09.11.00)	
(54) Title: FRAGMENT OF THE GYLCOPROTEIN CD55/DAF FOR PRODUCING HIGHLY EFFECTIVE ANTI-TUMOUR MEDICATIONS AND METHOD FOR USING THE SAME (54) Bezeichnung: FRAGMENT DES GLYCOPROTEINS CD55/DAF ZUR GEWINNUNG HOCHWIRKSAMER TUMORARZNEIEN SOWIE VERFAHREN ZU DESSEN VERWENDUNG (57) Abstract The invention relates to a substance and a method for producing anti-tumour agents. This substance corresponds to a fragment of the glycoprotein CD55/DAF and can also be used for diagnostic purposes (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft eine Substanz sowie ein Verfahren zur Gewinnung von Antitumormitteln. Diese Substanz entspricht einem Fragment des Glycoproteins CD55/DAF und kann auch für diagnostische Zwecke verwendet werden.			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						



**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 C07K14/705 A61K38/17 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 763 224 A (CARAS ET AL.) 9 June 1998 (1998-06-09) the whole document	1,5, 10-13
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 1997, 1997 Philadelphia, PA, US; abstract no. 68043, L BJORGE ET AL.: "Complement-regulatory proteins in ovarian malignancies " XP002142921 & INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 70, no. 1, 1997, pages 14-25, NEW YORK, NY, US ISSN: 0020-7136 abstract	1,5, 10-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 2000

Date of mailing of the international search report

07/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Masturzo, P

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>WO 99 43800 A (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED) 2 September 1999 (1999-09-02) the whole document</p>	1
P, X	<p>F HENSEL ET AL.: "Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/Decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis" CANCER RESEARCH, vol. 59, 15 October 1999 (1999-10-15), pages 5299-5306, XP002142920 MD US the whole document</p>	1-29

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5763224	A	09-06-1998	US 5374548 A	20-12-1994
			US 5264357 A	23-11-1993
			US 5109113 A	28-04-1992
			AU 629517 B	08-10-1992
			AU 2308788 A	01-03-1989
			DE 3854328 D	21-09-1995
			DE 3854328 T	28-03-1996
			EP 0371999 A	13-06-1990
			IL 87366 A	18-08-1993
			JP 2504467 T	20-12-1990
			JP 2935709 B	16-08-1999
			WO 8901041 A	09-02-1989
			AU 612572 B	18-07-1991
			AU 7242687 A	19-11-1987
			DE 3750379 D	22-09-1994
			DE 3750379 T	23-02-1995
			EP 0244267 A	04-11-1987
			JP 2713875 B	16-02-1998
			JP 8242882 A	24-09-1996
			JP 2686257 B	08-12-1997
			JP 63102699 A	07-05-1988
			AU 580430 B	12-01-1989
			AU 5965086 A	24-12-1986
			EP 0223842 A	03-06-1987
			JP 63500797 T	24-03-1988
			WO 8607062 A	04-12-1986
WO 9943800	A	02-09-1999	AU 2633099 A	15-09-1999

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**

IPK 7 C07K14/705 A61K38/17 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 763 224 A (CARAS ET AL.) 9. Juni 1998 (1998-06-09) das ganze Dokument	1,5, 10-13
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 1997, 1997 Philadelphia, PA, US; abstract no. 68043, L BJORGE ET AL.: "Complement-regulatory proteins in ovarian malignancies" XP002142921 & INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, Bd. 70, Nr. 1, 1997, Seiten 14-25, NEW YORK, NY, US ISSN: 0020-7136 Zusammenfassung	1,5, 10-13

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Juli 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/08/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 99 43800 A (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED) 2. September 1999 (1999-09-02) das ganze Dokument	1
P,X	F HENSEL ET AL.: "Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/Decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis" CANCER RESEARCH, Bd. 59, 15. Oktober 1999 (1999-10-15), Seiten 5299-5306, XP002142920 MD US das ganze Dokument	1-29

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5763224 A	09-06-1998	US 5374548 A	20-12-1994
		US 5264357 A	23-11-1993
		US 5109113 A	28-04-1992
		AU 629517 B	08-10-1992
		AU 2308788 A	01-03-1989
		DE 3854328 D	21-09-1995
		DE 3854328 T	28-03-1996
		EP 0371999 A	13-06-1990
		IL 87366 A	18-08-1993
		JP 2504467 T	20-12-1990
		JP 2935709 B	16-08-1999
		WO 8901041 A	09-02-1989
		AU 612572 B	18-07-1991
		AU 7242687 A	19-11-1987
		DE 3750379 D	22-09-1994
		DE 3750379 T	23-02-1995
		EP 0244267 A	04-11-1987
		JP 2713875 B	16-02-1998
		JP 8242882 A	24-09-1996
		JP 2686257 B	08-12-1997
		JP 63102699 A	07-05-1988
		AU 580430 B	12-01-1989
		AU 5965086 A	24-12-1986
		EP 0223842 A	03-06-1987
		JP 63500797 T	24-03-1988
		WO 8607062 A	04-12-1986
WO 9943800 A	02-09-1999	AU 2633099 A	15-09-1999

Statement of Accuracy of Translation

I, Melissa Stanford, a translator with Chillson Translating Service, 3530 Chas Drive, Hampstead, Maryland, 21074, hereby declare as follows:

That I am familiar with the German and English languages;

That I am capable of translating from German to English;

That the translation attached hereto is a true and accurate translation of German Application titled, "Substance for Obtaining Highly Effective Tumor Medications as well as a Process."

By Melissa Stanford

Date Jan 18, 2000

**Translator's Note:**

The term "Spiegelmere" could not be found in available sources and was translated simply as "spiegelmers" (German page 6, line 24; English page 7, line 7 from the bottom).



**Substance for Obtaining Highly Effective Tumor Medications  
as well as a Process**

**Description**

The invention relates to a substance as well as a process for obtaining anti-tumor agents.

Gastric carcinoma is one of the most common types of cancer worldwide. According to Lauren in "The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma," Acta Path Microbiol Scand; 64: 331-49, they are histologically divided into diffuse adenocarcinomas and intestinal adenocarcinomas. Intestinal gastric carcinomas are often accompanied by chronic gastritis B and especially by intestinal metaplasias, which are considered to be precursors of dysplastic alterations and of gastric carcinomas. Differences between these two types are also indicated in that patients with carcinomas of the diffuse type often belong to blood group A, from which it can be deduced that genetic factors influence the risk of cancer, while environmental factors, e.g., a Helicobacter pylori infection, are possibly of importance for the development of carcinomas of the intestinal type. It is noted that gastric-adenocarcinomas are becoming less common in the West but are now on the rise in the East.

Up until now, therapy has been limited to gastrectomy and lymphadenectomy, but because of the still poor prognosis, there is a need for a new accompanying therapy. Immunological studies have shown that even in cases in which the immune system cannot

effectively control malignant cells, a cellular and humoral activity can be measured, which is not sufficient, however, to destroy the tumor cells. A more effective effort is now to isolate the antibodies that originate from the immune response of the patient, to reproduce them in a suitable manner and to use them therapeutically. Thus, for example, antibodies that originate from patients with lung, esophageal and colon cancer were isolated, and human monoclonal antibodies that influence, e.g., direct differentiation and the growth of the tumor cells, but which in most cases have the problem of interaction with other tumors or healthy cells, were derived from them.

It is known that human monoclonal SC-1 antibodies can trigger apoptosis in gastric carcinoma cells (Vollmers et al., Cancer 49 (1989), 2471-2476). The antibody reacts with almost all adenocarcinomas of diffuse type and about 20% of the adenocarcinomas of intestinal type (Vollmers et al., Cancer 76 (1995), 550-558; Vollmers et al., Cancer 79 (1997), 433-440). In clinical studies, it was found that antibody SC-1 is able to induce a tumor-specific regression and apoptosis in primary stomach cancer without toxic cross-reactivity relative to normal tissue (Vollmers et al., Oncol. Rep. 5 (1998), 549-552).

Apoptosis is the programmed cell death, suicide of cells, by fragmentation of the DNA, plasmolysis and dilatation of the endoplasmatic reticulum, followed by cell fragmentation and the formation of membrane vesicles, the so-called apoptotic elements. Apoptosis, the physiological form of cell death, ensures a quick and smooth removal of unnecessary cells without triggering

inflammatory processes or tissue damages as in the case of necrosis. Under pathological conditions, it is also used to remove malignant cells, such as, for example, cancer precursor cells. It can be triggered by the most varied stimuli, such as, for example, by cytotoxic T-lymphocytes or cytokines, such as tumor necrosis factors, glucocorticoids and antibodies. It is the most common cause of death of eucaryotic cells and occurs in embryogeneses, metamorphoses and tissue atrophy. Apoptotic receptors on the cell surface, such as that of the NGF/TNF family, are predominantly expressed in lymphocytes, but are also found in various other cell types, and thus they are not suitable for cancer treatment. In in-vivo tests, ligands and antibodies for these receptors have led in particular to liver damage. Tumor-specific receptors with an apoptotic function are therefore especially important.

The cellular receptor of monoclonal antibody SC-1 was previously not known. Within the scope of the studies that resulted in this invention, it was possible to identify this cellular receptor. This identification turned out to be difficult, however. On the one hand, monoclonal antibody SC-1 reacts with its receptor only under quite specific stringency conditions in the Western-blot analysis. On the other hand, unspecific reactions that are caused by denaturation artifacts are found with a number of other proteins.

The cellular receptor of antibody SC-1 is an isoform of the protein CD55/DAF that is specific for tumor cells, especially for gastric carcinoma cells (Medof et al., J. Exp. Med. 160 (1984),

1558-1578; Caras et al., Nature 325 (1987), 545-549; Bjorge et al., Int. J. Cancer 70 (1997), 14-25), which does not occur in normal tissue. The specific receptor properties of this isoform are based on a special glycostructure that is connected with the protein backbone via an N-linkage. The tumor-specific receptor can be used in a screening process for identifying specific binding partners. Specific partners for binding to the receptor are those substances within the meaning of this invention that bind selectively to a tumor-specific glycostructure but not significantly to a glycostructure of CD55/DAF that occurs in normal cells and preferably have the ability to induce apoptosis. These specific binding partners can be used for the production of therapeutic agents for inducing apoptosis and/or for combatting tumors as well as for the production of diagnostic agents.

The binding of antibody SC-1 to the tumor-specific N-linked glycostructure of the CD55/DAF protein induces a tyrosine phosphorylation of three proteins and the activation of caspase-3 and caspase-8. In addition, it was found that the apoptosis induced by antibody SC-1 leads to a transient increase of the presentation of tumor-specific N-glycosylated CD55/DAF on the surface of tumor cells. This increased presentation can be caused by an increased expression and/or by an increased glycosylation. The tumor-specific N-glycosylated CD55/DAF protein then disappears from the cell membrane by endocytosis.

94 In addition, a cleavage of cytokeratin 18, an increased expression of c-myc and a reduction of the expression of topoisomerase II $\alpha$  and thus an at least partial cell cycle arrest

are observed. The apoptotic processes that are induced by SC-1 do not result in an increased cleavage of poly (ADP-ribose)-polymerase (PARP). In addition, an increase of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, which is released from an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pool, is found. An inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  release inhibits the apoptosis that is induced by SC-1.

A first aspect of the invention relates to a glycoprotein that comprises at least one section of the amino acid primary structure of CD55/DAF, especially the membrane-bonded isoform DAF-B and a glycostructure that is specific for tumor cells, especially such a glycostructure that reacts with monoclonal antibody SC-1. In SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis (under reducing conditions), such a glycoprotein that can be obtained from, for example, human adenocarcinoma cell line 23132 (DSM ACC 201) or from other human adenocarcinoma cell lines, such as 3051 (DSM ACC 270) or 2957 (DSM ACC 240) or from primary tumor cells of gastric adenocarcinoma patients has an apparent molecular weight of about 82 kD. In addition to this 82 kD of protein, the invention also relates to variants with deletions, insertions and/or substitutions in the amino acid primary structure, which, however, have a glycostructure that is analogous to the natural protein, i.e. tumor-specific and preferably reactive with antibody SC-1.

The glycoprotein according to the invention can be obtained by membrane preparations being produced from cells that express a protein with the desired glycostructure, e.g., from cells of human adenocarcinoma cell line 23132 or from other human

adenocarcinoma cell lines, and the glycoprotein is obtained from this by chromatographic processes, e.g., by size-exclusion and/or anion-exchange chromatography. The production of the membrane preparations is carried out preferably by lysis of cells in hypotonic buffer, ultrasound treatment and subsequent separation of the nuclei. The membrane preparations can be isolated from the remaining extract by centrifuging and further purified by chromatographic methods.

The tumor-specific CD55/DAF-glycoprotein can be used in a test process, in which the ability of a substance to bind to the tumor-specific glycoprotein, especially to its glycostructure, is determined. The test process can be automated as a high-throughput-screening process. In this respect, the glycoprotein can be used in isolated form, as a cell extract, in particular as a membrane preparation or in the form of complete cells, in particular of human adenocarcinoma cell line 23132 or another human adenocarcinoma cell line, or a heterologous eucaryotic cell that is transformed with the CD55 gene, e.g., a mammal cell, which is able to produce a protein with the correct glycostructure. As a control, the binding of the tested substance to a non-tumor CD55/DAF-glycoprotein can be examined, which can be obtained from normal human cells or cell lines. Substances that bind selectively to the tumor-specific glycoprotein are suitable for the production of therapeutic and/or diagnostic agents.

In addition, the ability of the tested substance to induce apoptosis, especially in tumor cells, and/or the ability to

induce a phosphorylation cascade that is mediated by CD55/DAF is preferably determined. The induction of the apoptosis can be performed by morphological cell studies, by apoptosis test processes, e.g., by an adhesion test (Vollmers et al., Cell 40 (1985), 547-557) determining the keratin-1 and DNA-fragmentation, or by proliferation tests such as the MTT-proliferation test. As an alternative, a determination of caspase activities, for example activities of caspase-3 and/or caspase-8 or a determination of the intracellular free calcium concentration can also be carried out. Substances that selectively induce an apoptosis of tumor cells can be used as anti-tumor-action substances. The induction of the phosphorylation cascade can be monitored by use of antibodies that are specific for phosphorus groups, e.g., phosphotyrosine and/or phosphoserine groups.

Pharmacologically compatible substances are suitably tested. These include low-molecular pharmacological active ingredients, but especially peptides, peptide mimetic agents, antibodies, e.g., polyclonal, monoclonal or recombinant antibodies, antibody fragments or antibody derivatives. Other examples of ligands of the CD55/DAF receptor are aptamers (NexStar Pharmaceuticals, 2860 Wilderness Place, Boulder, Colorado 80301, USA) and spiegelmers (Noxxon Pharma, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin). Especially preferred, for example, are recombinant antibodies, such as, for example, single-chain scFv-antibodies, as they can be produced in, for example, bacteria cells such as, for example, E. coli (Plückthun, Bio/Technology 9 (1991), 545-551 and bibliographic references that are cited therein) or else in eucaryotic host

cells (Reff, Curr. Opinion Biotech. 4 (1993), 573-576 and Trill et al., Curr. Opinion Biotech 6 (1995), 553-560 or bibliographic references that are cited therein). In addition, human antibodies, i.e., antibodies with human constant domains, are preferred, as they are produced in the human body, e.g., of carcinoma patients, or chimera and humanized antibodies, in which originally present non-human constant domains and/or framework regions were exchanged by corresponding human areas. Examples of antibody fragments are Fab-, F(ab)<sub>2</sub>- or Fab'-fragments, as they can be obtained by proteolytic cleavage of antibodies. The antibody derivatives include, for example, conjugates of antibodies with labeling groups and/or effector groups, for example toxic substances such as, for example, cholera toxin or pseudomonas Exotoxin A or radioactive substances.

Another aspect of the invention is the use of substances that bind specifically to tumor glycoprotein CD55/DAF according to the invention (with the exception of already known monoclonal antibody SC-1) for the production of the apoptosis-inducing agents and/or for the production of anti-tumor agents and/or for the production of agents for tumor diagnosis. A tumor-specific or tumor-selective binding within the context of this application preferably means that in immunohistochemical detection, a substance reacts with tumor cells but not significantly with other cells. An induction of the apoptosis within the context of this application means an increase of the apoptosis index, i.e., the proportion of apoptotic cells after treatment with the substance compared to the proliferating cells is higher than



without treatment, preferably higher than 50%. The spontaneous apoptosis index without treatment is significantly below 10%, whereby the detection of proliferating cells can be done with antigen Ki67.

Still another aspect of the invention is a process for the preparation of agents that induce apoptosis and/or anti-tumor agents and/or for the production of agents for tumor diagnosis, whereby a potentially active substance is tested on its ability for specific binding to a glycoprotein according to the invention, and in the case of a positive test result, the substance is converted into a form for dispensing that is suitable for pharmaceutical applications optionally together with commonly used adjuvants, additives and vehicles.

Suitable pharmaceutical forms for dispensing contain the active ingredient in a therapeutically effective quantity, especially in an anti-tumor-action quantity. The dose that is administered to a patient and the treatment time depend on the type and severity of the disease. Suitable dosages for the administration of antibodies are described in, for example, Ledermann et al. (Int. J. Cancer 47 (1991), 659-664) and Bagshaw et al. (Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4 (1991), 915-922).

The active ingredient can be administered alone or in combination with other active ingredients either simultaneously or sequentially. In addition to the active ingredient, the pharmaceutical composition can contain other pharmaceutically common substances. The composition can be administered, for

example, orally, nasally, via a pulmonary pathway or by injection. Compositions that can be administered orally can be present in the form of tablets, capsules, powders or liquids. Compositions that can be administered by injection are usually in the form of a parenterally compatible aqueous solution or suspension.

In addition, the invention relates to a process for combatting tumors, whereby an anti-tumor-action quantity of a substance that can bind specifically to a glycoprotein according to the invention with the exception of monoclonal antibody SC-1 is administered to a patient, especially a human patient.

Binding partners for tumor-specific CD55/DAF proteins can also be used for diagnostic purposes, e.g., for tumor imaging. Suitable methods for tumor imaging are described in, e.g., Steinstraesser et al. (Clinical Diagnosis and Laboratory Medicine 2 ((1989), 1-11). In this respect, the binding partners are preferably used in the form of conjugates with labeling groups, e.g., radioactive or fluorescent labeling groups. As an alternative, the binding partners can also be incubated in unconjugated form with the sample that is to be tested, and then stained with a secondary binding reagent.

A subject of the invention is thus a process for the diagnosis of tumors, whereby a sample that is to be tested, e.g., a bodily fluid or a tissue sample, or a patient can be brought into contact with a substance that can be bonded to a tumor-specific CD55/DAF glycoprotein, and the presence, the

localization and/or the quantity of the glycoprotein in the sample or in the patient can be detected.

The use of substances that specifically bind tumor glycoprotein CD55/DAF to trigger a phosphorylation cascade is also a subject of the invention. Still another subject of the invention is the use of substances that bind specifically to tumor glycoprotein CD55/DAF for transient increase of the presentation of tumor glycoprotein CD55/DAF to the cell surface, which can be caused by an increased glycosylation and/or expression. The tumor-specific glycoprotein then disappears from the cell surface. Still another subject of the invention is the use of substances that bind selectively to tumor glycoprotein CD55/DAF to increase the intracellular calcium level. Substances that bind specifically to tumor glycoprotein CD55/DAF can also be used as agents for cell cycle arrest. Finally, the invention also relates to the use of substances that bind specifically to tumor glycoprotein CD55/DAF to induce apoptotic processes that do not include any cleavage of PARP. The substance can optionally be used as conjugates with labeling groups and/or effector groups.

Still another subject of the invention is the use of substances that bind specifically to tumor glycoprotein CD55/DAF, especially antibody SC-1 for inducing apoptosis in dormant tumor cells. As far as the inventor knows, this finding is not known to date for any tumor-selective substance.

The substances that bind tumor-specific glycoprotein CD55/DAF preferably contain multiple, i.e. at least two, binding

sites for CD55/DAF. For example, the substances can contain three, four, five, six, seven, eight, nine, ten or more binding sites, so that a cross-linking is produced in binding to intracellular tumor-specific CD55/DAF. To obtain substances with multiple binding sites, binding molecules can optionally be cross-linked. The cross-linking can be carried out by, for example, chemical coupling with, e.g., bifunctional linker molecules or with highly affine interactions, e.g., streptavidin/biotin. Even if the CD55/DAF binding molecules are, for example, antibodies, e.g., IgG or IgM, that already contain several binding sites, an improvement of the apoptosis induction can be achieved by cross-linking with, e.g., anti-IgG or anti-IgM antibodies. The use of cross-linked antibodies is therefore preferred.

Cell line 23132 can be obtained from the Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH], Braunschweig [Brunswick], under file number DSM ACC 201.

In addition, the invention is explained by the examples and figures below. Here:

- Figure 1 shows:
- the identification of antigens that are reactive with antibody SC-1.
  - a. Purification of SC-1 antigens from membrane extracts of gastric carcinoma cell line 23132.
  - b. Sequencing of an 82 kD protein that is identified as an SC-1 antigen by

nanoelectrospray-tandem-mass  
spectroscopy.

Figure 2 shows: the influence of a cleavage of GPI anchors by phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) on a staining with SC-1. Untreated gastric carcinoma cells of cell line 23132 stained with SC-1 (a) and anti-EMA (c); cells that are treated with PI-PLC and stained with SC-1 (b) and anti-EMA (d) (400 x magnification).

Figure 3 shows: the result of an MTT test with antibody SC-1 in gastric carcinoma cells. Control: untreated cells; SC-1: cells treated with SC-1; SC-1, PIPLC: cells treated with phospholipase and then with SC-1.

Figure 4 shows: the result of an analysis of transient transfected cells with a CD55-antisense vector. Cells that were transfected with a control vector show a normal staining pattern with SC-1 (a) and anti-CEA (c). In cells that are transfected with the antisense vector, the staining with SC-1 is reduced (b), while no change in the staining with anti-CEA (d) can be detected.

Figure 5 shows: the result of a Klenow fragmentation test. Transfixed cells show no apoptosis without induction with SC-1 (e) in comparison to a positive control (f). After incubation with SC-1, the cells that are transfixed with the control vector indicate apoptosis (g), while the majority of the cells that are transfixed with the CD55 antisense vector are resistant to apoptosis (h).

Figure 6 shows: a quantitative determination of the apoptosis that is induced by SC-1. Cells that were transfixed with the control and the CD-55 antisense vector were incubated with SC-1, and cytopins of these cells were stained with the Klenow DNA fragmentation kit. The percentages of apoptotic cells were determined by two different individuals by counting apoptosis-positive and negative cells in three different fields with about 500 cells in each case.

Figure 7 shows: the action of a deglycosylation on the binding of antibody SC-1.

a: Tumor cells incubated with buffer and stained with SC-1;

- b: cells incubated with N-glycosidase and with SC-1;
- c: cells incubated with buffer and anti-CD55 and
- d: tumor cells incubated with N-glycosidase and anti-CD55.

Figure 8 shows: the result of an MTT test with SC-1 in gastric carcinoma cell line 23132.

- a: Titration of SC-1;
- b: Cross-linking of SC-1 with rabbit-anti-human-IgM-antibodies;

Figure 9 shows: the change in intracellular calcium concentration after induction of cell line 23132 with SC-1. At point 1, the addition of SC-1 or control antibodies is carried out. At point 2, the cells were washed with Ringer's solution.

Figure 10 shows: the expression and activity patterns of caspase-3 and caspase-8 after induction with SC-1.

- a. Western-blot analysis of caspase-3 and caspase-8. The activation of caspase-3 based on proteolytic cleavage can be detected by the production of the p20 cleavage product.

- b. The result of an activity determination of caspase-8. A four-fold increase of caspase-8 activity was found 20 hours after apoptosis was induced.

Figure 11 shows: the phosphorylation pattern of cell line 23132 after apoptosis is induced.

- a: A quick phosphorylation of tyrosine radicals in proteins with molecular weights of about 110 kD and 60 kD as well as the dephosphorylation of a serine radical in a protein with about 35 kD was found after apoptosis was induced with SC-1.
- b: An increase of phosphorylation of a tyrosine radical in a 75 kD protein with a maximum after 10 minutes was found after apoptosis was induced.

Figure 12 shows: an expression and mutation analysis of p53.

- a: 5 minutes after apoptosis was induced by SC-1, a significant increase of the mRNA concentration was found, while the high p53 protein concentrations remain unchanged.



- b: A sequential analysis of p53 showed a mutation in codon 273, which results in an amino acid exchange from Arg to His.

Figure 13 shows: an expression analysis of p21.

After apoptosis is induced, an increase of the p21 mRNA concentration was found.

Figure 14 shows: a Western-blot analysis of SC-1-induced cells.

- a: CD55/DAF expression (staining with SC-1)
- b: cleavage of PARP (staining with anti-PARP-antibodies)
- c: staining with anti-topoisomerase II $\alpha$ -antibody as a marker for cellular proliferation
- d: c-myc expression (staining with anti-c-myc-antibody)

Figure 15: the action of the caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO on the SC-1-induced apoptosis.

Figure 16: the detection of a tumor cell-specific apoptosis by in-situ nucleus staining produced by administration of antibody SC-1 on a primary tumor.

Figure 17: the action of the administration of antibody SC-1 on a primary tumor.

- a: Biopsy sample before administration of SC-1 (in situ staining for apoptosis)
- b: primary tumor after administration of SC-1 (in situ staining for apoptosis)
- c: biopsy before administration of SC-1 (histological regression analysis)
- d: primary tumor after administration of SC-1 (histological regression analysis).

## **Examples**

### **1. Material and Methods**

#### **1.1 Cell Culture**

For all tests, the established gastric-adenocarcinoma cell line 23132 was used (Vollmers et al., Virchows Arch. B. Zell. Pathol. Incl. Mol. Pathol. 63 (1993), 335-343). The cells were cultivated in RPMI-1640 with 10% fetal calf serum and penicillin/streptomycin (both 1%) until a subconfluence occurred. For the described test process, cells were dissolved with trypsin/EDTA and washed twice with phosphate-buffered salt solution (PBS) before use. Human hybridoma cell line SC-1 was produced and cultivated as described in Vollmers et al. (Cancer Res. 49 (1989), 2471-2476).

#### **1.2 Purification of Antibody SC-1**

Human monoclonal antibody SC-1 was purified from mass cultures with use of cation-exchange chromatography followed by gel filtration, as described in Vollmers et al. (Oncology Reports 5 (1998), 35-40).

#### **1.3 Purification of the SC-1 Receptor**

For preparation of membrane proteins, harvested cells in hypotonic buffer (20 mmol of HEPES, 3 mmol of KCl, 3 mmol of  $MgCl_2$ ) were resuspended, incubated for 15 minutes on ice and ensonified for 5 minutes. The nuclei were pelletized by centrifuging (10,000 g, 10 minutes). The membranes were

pelletized by centrifuging (30 minutes, 100,000 g) and resuspended in membrane lysis buffer (50 mmol of HEPES, pH 7.4, 0.1 mmol of EDTA, 1 M of NaCl, 10% glycerol and 1% Triton X-100). Complete<sup>(R)</sup> protease inhibitor (Boehringer Mannheim, Germany) was added to all solutions.

The purification of the antigens was carried out by column chromatography with use of an FPLC unit (Pharmacia, Freiburg, Germany). For size-exclusion chromatography, a Pharmacia Superdex 200 column (XK 16/60) was loaded with 5 mg of membrane protein preparation in buffer A (100 mmol of Tris HCl, pH 7.5, 2 mmol of EDTA, 40 mmol of NaCl, 1% Triton X-100). The column eluate was fractionated and studied in a Western-blot analysis in a reaction with antibody SC-1. Positive fractions were loaded on a monoQ-column with use of buffer A. The bonded proteins were fractionated with a linear gradient with use of buffer B (100 mmol of tris-HCl, pH 7.5, 1 M of NaCl, 2 mmol of EDTA, 1% Triton X100) and studied by SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis and staining with Coomassie or Western-blot analysis. Positive strips were cut out from the gel and sequenced.

#### **1.4 Preparation of Cell Lysates after Induction with SC-1**

Cell line 23132 was cultivated in 100 mm cell culture dishes until a subconfluence occurred. Antibody SC-1 was added in a final concentration of 30 µg/ml for the time period indicated in each case. Then, the culture plates were washed once with PBS, and the cells were lysed directly with SDS buffer (50 mmol of tris-HCl, pH 6.8, 10 mmol of dithiothreitol, 2% (w/v) SDS, 10%

(v/v) glycerol). The cell residues were collected with a rubber scraper.

### 1.5 Gel Electrophoresis and Blots

The SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis under reducing conditions and the Western-blotting of proteins were performed with use of standard protocols as described in Vollmers et al. (Cancer 79 (1997), 433-440). Nitrocellulose membranes were blocked with PBS with the addition of 0.1% Tween-20 and 2% skim milk powder or 3% bovine serum albumin (for determination of phosphorylation) and then incubated for one hour with the primary antibody. The antibodies were used in the following dilutions: SC-1 (human) 10  $\mu\text{g/ml}$  or 15  $\mu\text{g/ml}$ ; anti-caspase-3 or -8 (goat) (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) 5  $\mu\text{g/ml}$ , streptavidin anti-phosphotyrosine conjugate (clone PT-66) 1:20,000 and streptavidin anti-phosphoserine conjugate (clone PSR-45) 1:30,000 (Sigma, Munich, Germany), mouse-anti-topoisomerase II $\alpha$ -antibody 1:1,000 (Neomarkers, Baesweiler, Germany), anti-c-myc-antibody 1:1,000 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) and anti-PARP-antibody 1:1,000 (Pharmingen, Heidelberg, Germany). The secondary antibody peroxidase-rabbit-anti-human-IgM conjugate or rabbit-anti-goat-antibody (Dianova, Hamburg, Germany) and peroxidase-conjugated extravidin (Sigma) were detected with the SuperSignal Chemiluminescence Kit of Pierce (KMF, St. Augustin, Germany).

### 1.6 Protein Sequencing

A protein strip with an apparent molecular weight of 82 kD was isolated by one-dimensional polyacrylamide gel electrophoreses and made visible by staining with Coomassie. The p82-strip was cleaved in the gel with trypsin (Boehringer Mannheim, non-modified, sequencing quality) as described in Shevchenko et al., (Anal. Chem. 68 (1996), 850-858). The non-separated pool of tryptic peptides was sequenced by nanoelectrospray-tandem-mass spectrometry as described by Wilm et al. (Nature 379 (1996), 466-469). The sequencing was carried out on an API III Triple Quadrupol Mass Spectrometer (PE Sciex, Ontario, Canada). The sequences of the peptide fragments were assembled with use of the tandem-mass spectrometric data and categorized in the respective proteins by data bank research.

### 1.7 RT-PCR

The cDNA synthesis of the entire RNA of tumor cells 23132 was carried out with 5 µg of total RNA with use of M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) according to the information of the manufacturer. The PCR reactions were performed in a reaction volume of 25 µl with 1.75 mmol of MgCl<sub>2</sub>, 0.4 pM of primer, 200 µM of each dNTP and 1 U of Taq polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany).

The following PCR products were produced:

CD55 (640 bp fragment from the sequence range of bp 382 to 1022), p53 fragment 1 (850 bp fragment from the sequence range of

91 to 940), p53-fragment 2 (800 bp from the sequence range of 492 to 1294).

### **1.8 Cloning Procedures**

The PCR products were purified from an agarose gel with use of the Jetsorb gel-extraction kit (Genomed, Bad Oeynhausen, Germany). The cloning of the PCR fragments was carried out with the pCR script Amp SK (+) cloning kit (Stratagene, Heidelberg, Germany).

The cloning of the antisense vector pHOOK2-CD55-anti was carried out by smoothing of the CD55-PCR product with Pfu-polymerase and cloning in the expression vector pHOOK2 that is cut with SmaI (Invitrogen, Leek, The Netherlands). A clone with antisense direction of the insertion under control of the  $P_{CMV}$  promoter was selected for the antisense experiment.

### **1.9 DNA Sequencing**

Eight positive clones were sequenced with use of the DyeDeoxy Termination Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystems, Inc., Weiterstadt, Germany), and the automated DNA sequencer ABIPrism 373 was analyzed. Both strands were sequenced with use of T3 and T7 primers. The sequences were analyzed with use of the computer program DNASIS and BLAST.

### **1.10 Transfection**

For transfection experiments,  $2.5 \times 10^7$  dissolved cells in tris-buffered salt solution (TBS) were washed and resuspended in

400  $\mu$ l of TBS. After 10  $\mu$ g of plasmid DNA was added, the cells were pulsed with 240 V, 960 nF with an electroporation device of BioRad (Munich, Germany).  $5 \times 10^5$  transfected cells were saturated on a 60 mm cell culture dish and incubated for 24 hours as described above. The apoptosis was induced by adding 50  $\mu$ g/ml of purified SC-1 antibody to the growth medium. After 24 hours, the cells were treated with trypsin and used for the production of cytopins.

#### **1.11 Phospholipase Test**

Dissolved and deleted cells were resuspended in RPMI-1640 with additives and incubated for 90 minutes at 37°C. After this rest period, 20 mU/ml of PI-PLC (Boehringer Mannheim) was added, and the cells were incubated for another 60 minutes. Finally, the cells were washed and used for the production of cytopins.

#### **1.12 Glycosidase Test**

Dissolved and washed cells were resuspended in RPMI-1640 with 10% fetal calf serum, incubated for 1 hour in ice, then counted, and cytopins were produced. After air drying, the cytospin preparations were fixed with acetone (10 minutes), washed and incubated with 20  $\mu$ U/ml of O-glycosidase or 5 mU/ml of N-glycosidase (Boehringer Mannheim) for 4 hours at 37°C.

#### **1.13 Immunohistochemical Staining**

The following antibodies were used for the immunohistochemical staining: purified antibody SC-1, anti-CEA-



antibody (DAKO, Hamburg, Germany), Anti-EMA-antibody (Loxo, Dossenheim, Germany) and anti-CD55-antibody (Biozol, Eiching, Germany). The acetone setting and staining of the cytopsin preparations were carried out as described by Vollmers et al. (Hum. Antibodies Hybridomas 7 (1996), 37-41).

For immunohistochemical staining of apoptotic cells, cells that were cultivated until subconfluence occurred were incubated with purified antibody SC-1 (diluted to 50 µg/ml) in full growth medium for up to 96 hours. Adherent and dissolved cells were collected, centrifuged and resuspended in complete growth medium. After cells were counted, cytopsin preparations were produced and dried overnight at room temperature. In studying the cleavage of cytokeratin 18 in vivo, biopsies were taken from patients before treatment with SC-1 and tissue sections after treatment and gastrectomy as described in Vollmers et al., (Oncol. Rep. 5 (1998), 549-552).

The cytopsins were blocked with bovine serum albumin (15 mg/ml) in phosphate-buffered salt solution (PBS) for 30 minutes. Then, incubation was carried out for 1 hour with SC-1 supernatant, M30 cyto death-antibody (Roche Biochemicals, Mannheim, Germany) or mouse-anti-cytokeratin 18 antibody (DAKO, Hamburg, Germany) diluted at 1:15. Then, it was washed for 30 minutes in PBS, followed by incubation with peroxidase-labeled rabbit-anti-mouse or rabbit-anti-human conjugate (DAKO), diluted at 1:25. After 30 minutes of washing with PBS, staining was carried out with diaminobenzidine (0.05%) and hydrogen peroxide (0.02%) for 3 minutes at room temperature. The reaction was

stopped with tap water, and the tissue sections were counterstained with hematoxylin.

#### **1.14 Apoptosis Tests**

Cytospin preparations (5,000 cells/slides) were fixed in acetone and then washed with TBS. Then, they were stained with the FragE1-Klenow DNA-Fragmentation Kit (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Germany) according to manufacturer information.

An ELISA for detection of apoptosis was performed with use of the Cell Death Detection<sup>(R)</sup> Kit (Roche Biochemicals) according to the manufacturer's instructions.

#### **1.15 MTT Test**

The MTT proliferation test (Carmichael et al., Cancer Res. 47 (1987), 936-942) for determining the apoptosis activity of antibody SC-1 on gastric carcinoma cells was performed as described in Vollmers et al. (Cancer 76 (1995), 550-558). The determination of cell growth was carried out by the mitochondrial hydroxylase test (Mossmann, J. Immunol. Meth. 65 (1983), 55-63). The percentage portion of apoptotic cells was determined from the absorption of the cells that were induced with SC-1 and the control that was not induced with SC-1 (Vercammen et al., J. Exp. Med. 188 (1998), 919-930).

#### **1.16 Caspase-3 and Caspase-8 Tests**

The activation of caspase-8 and caspase-3 was determined with the ApoAlert<sup>TM</sup> Caspase Fluorescence Test Kit (Clontech,

Heidelberg, Germany). In this connection,  $1 \times 10^6$  cells with 40  $\mu\text{g/ml}$  of SC-1 were incubated for 7 or 20 hours. Then, the cells were collected, resuspended in cell-lysis buffer, and the caspase activity was determined according to manufacturer information.

### 1.17 Determination of Intracellular Free Calcium [ $\text{Ca}^{2+}$ ]

The determination of the intracellular free calcium concentration was determined with use of the calcium-sensitive dye Fura-2-AM as described by Grykiewicz et al. (J. Biol. Chem. 260 (1985), 3440-3450). In this connection, the cells were incubated for 15 minutes with a Fura-2-AM in Ringer's solution that contains a final concentration of  $5 \times 10^{-6}$  M (122.5 mmol of NaCl, 5.4 mmol of KCl, 1.2 mmol of  $\text{CaCl}_2$ , 0.8 mmol of  $\text{MgCl}_2$ , 1 mmol of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5.5 mmol of glucose, 10 mmol of HEPES, pH 7.4). After flushing, the slides were examined with an Axiovert 100 TV microscope (400-fold magnification). The fluorescence signal was measured at 500 nm with excitation wavelengths that alternate between 334 and 380 nm with use of a 100-W xenon lamp and an automatic filter changing device (Zeiss, Germany). The concentration of intracellular free calcium was calculated according to the method of Grynkiewicz et al. (supra) with the assumption of a dissociation constant of 225 nmol/l. The maximum and minimum fluorescence ratios ( $R_{\text{max}}$  and  $R_{\text{min}}$ ) were measured after calibrating solutions were added.  $R_{\text{max}}$  was determined after a Ringer's solution with 3 mmol  $\text{Ca}^{2+}$  and  $10^{-6}$  M of ionomycin was added.  $R_{\text{min}}$  was determined in the presence of a  $\text{Ca}^{2+}$ -free Ringer's solution with 3 mmol of EGTA and  $10^{-6}$  M of ionomycin.

### **1.18 Inhibition of Intracellular Calcium Release**

Cells were washed once with phosphate-buffered salt solution and washed for 24 hours in calcium-free DMEM medium without fetal calf serum (FCS). Then, purified SC-1 antibody was added until a final concentration of 40  $\mu\text{g/ml}$  was reached. As a control, the same cells were used without SC-1. The cells were incubated in a wet incubator for another 24 or 48 hours and then fixed with 3% glutaric aldehyde. The cell culture plates were then examined for morphological changes with the aid of a light microscope.

## **2. Results**

### **2.1 Purification of the SC-1-Receptor CD55**

In Western-blot analysis of extracts from total cell lysates of gastric carcinoma cell line 23132, which had been produced under low-salt conditions (100 mmol of NaCl), antibody SC-1 reacted with a protein with a relative molecular mass of about 50 kD. By altering the stringency (1 M of NaCl) and with use of membrane preparations, it was possible to detect other proteins with approximately 70 kD and approximately 82 kD (Figure 1a, trace 1). These proteins were isolated from the membrane fractions and purified by sequential size-exclusion and anion-exchange chromatography (Figure 1a, traces 2, 3). The molecules were cut out from SDS-polyacrylamide gels and sequenced.

The 50 kD protein was identified as a dihydrolipoamide-succinyltransferase (gene bank access no. L37418), and the 70 kD protein was identified as the human Lupus p70 auto-antigen protein (gene bank access no. J04611). These proteins are

cytoplasmatic or nuclear antigens. Since antibody SC-1 in immunohistochemical studies binds only to cell surface antigens, the reactivity can presumably be attributed to unspecific binding based on the protein denaturation during the Western-blot analysis.

The 82 kD protein was identified as CD55 (DAF, gene bank access no. M31516, Figure 1b, sections 1 and 2). In humans, CD55 exists in two genetically specified isoforms (secreted DAF-A and membrane-bonded DAF-B), which are produced by differential splicing (Caras et al., Nature 325 (1987), 545-549). It was found by RT-PCR analysis that cell line 23132 expresses only the membrane-anchored DAF-B isoform.

## **2.2 Phospholipase Treatment**

The influence of a cleavage of the glycosidphosphatidyl-inositol (GPI)-anchor on the bond of SC-1 was analyzed by immunohistochemical studies and in the MTT-proliferation test. In this connection, the GPI-anchor was cleaved by incubation with phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC). Cytospins of cells that were treated with PI-PLC and untreated cells were stained immunohistochemically with SC-1, anti-CD55 and anti-EMA (epithelial-membrane-antigen). A comparison with untreated cells (Figure 2a) shows a loss in staining intensity in cells that are treated with PI-PLC and stained with SC-1 (Figure 2b). In the case of staining with anti-EMA (Figure 2c, d), no difference in staining was found, which indicates that the PI-PLC treatment has no effect on non-GPI-anchored membrane proteins.

In the MTT test, a treatment of cells with phospholipase C resulted in a significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) of the apoptotic cells (Figure 3).

### **2.3 Transfection with Antisense-CD55 RNA**

Cell line 23132 was transiently transfected with the CD55 antisense-vector pHOOK2-CD55anti and the control vector pHOOK2 by electroporation. First, cytopins of transfected cells were immunohistochemically stained with SC-1, anti-CD55 and anti-CEA (carcino-embryonal antigen). The cells that were transfected with the control vector showed an intensive staining with SC-1 and CEA (Figure 4a, c). In cells that were stained with the CD55 antisense vector, almost no staining with SC-1 was found (Figure 4b). The staining with anti-CEA-antibodies showed that the expression pattern of the CEA (also GPI-anchored) is not affected by the transfection with the antisense vector. Consequently, the expression of CD55 was reduced specifically based on the expression of the antisense RNA.

To analyze whether the expression of antisense-CD55 RNA also inhibits the SC-1 induced apoptosis, the cells were incubated for one day after the transfection with and without 30  $\mu\text{g/ml}$  of SC-1 for a period of 24 hours. Cytopins of cells that were transfected with the antisense vector and the control vector were stained with the FragE1 Klenow DNA Fragmentation Kit for the detection of a DNA-fragmentation induced by apoptosis. While untransfected cells that are treated with two plasmids show almost no spontaneous apoptosis (Figure 5e), a considerable reduction in

the apoptosis of cells that are transfected with the CD55 antisense vector (Figure 5g) in comparison to cells that are transfected with the control vector (Figure 5h) is found after incubation with SC-1.

A quantitative determination showed that spontaneous apoptosis in transfected 23132 cells occurred with a frequency of 6%, while 85% of the cells that were transfected with the control vector showed an apoptosis after incubation with SC-1. This apoptotic reaction was reduced to 21% by transfection with the CD55 antisense vector (Figure 6).

#### **2.4 Glycosidase Treatment**

The influence of a protein deglycosylation on the bond of SC-1 to cell line 23132 was studied by incubation of cytospin preparations with O- and N-glycosidases before the immunohistochemical staining. A treatment of cells with N-glycosidase resulted in a significant reduction of the SC-1 staining (Figure 7b), while a staining with anti-CD55, which detects the proportion of protein in the SCR3 region, was not influenced by protein deglycosylation (Figure 7d). Incubation with phosphate buffer and a treatment with O-glycosidase had no effect on the SC-1 bond. This shows that the specificity of SC-1 must be located in N-linked sugar radicals and not in the primary protein sequence.

### **2.5 Cross-linking of CD55/SC-1**

The cells were incubated for 24 hours with increasing quantities of SC-1 to determine the optimum apoptotic activity of SC-1 (Figure 8a). Then, crosslinking was carried out at a concentration of 40  $\mu\text{g/ml}$  of SC-1 with rabbit-anti-human IgM. After incubation for 48 hours, a 47% higher portion of dead cells than in the control cells that are incubated with SC-1 was found (Figure 8b).

### **2.6 Calcium Level**

To examine whether the apoptosis that is induced by SC-1 is accompanied by changes of the calcium level, the intracellular calcium concentration of cell line 23132 was determined after induction with SC-1 and control antibodies (unspecific human IgM). In this case, a significant increase of the intracellular calcium concentration was found approximately 1 minute after SC-1 antibody was added, while the control antibody had no effect (Figure 9).

### **2.7 Caspase Activity**

It was found by Western-blot analysis that caspase-3 and caspase-8 are regulated upward after induction of cell line 23132 with SC-1 (Figure 10a). A proteolytic cleavage that causes the activation of caspases was detected for caspase-3 by identifying cleavage product p20 (Figure 10a). In caspase-8, a four-fold increase of the activity was found 20 hours after induction with



SC-1, which indicates a significant participation of this caspase in the apoptosis process (Figure 10b).

The addition of the specific caspase-3 inhibitor AC-DEVD-CHO (Alexis Biochemicals, Grünberg, Germany) showed, surprisingly enough with increasing concentration, an increase of apoptosis in the case of determination with the Cell Death Detection<sup>(R)</sup> Kit (Figure 15).

## **2.8 Protein Phosphorylation**

After induction of cells with 40 µg/ml of SC-1 antibodies, the phosphorylation pattern was examined by Western-blot analysis of cytoplasmatic and membrane extracts. In this case, an early tyrosine phosphorylation of 110 kD and 60 kD of proteins was found 30 to 60 seconds after apoptosis was induced (Figure 11). The 60 kD protein was found only in the cytoplasm, while the 110 kD protein could be detected both in the plasma and in the membrane extract. In addition, a slow tyrosine phosphorylation of a cytoplasmatic 75 kD protein with a maximum was found after 10 minutes, and the complete disappearance of the serine phosphorylation of a 35 kD protein was found 10 minutes after induction.

## **2.9 Expression and Sequencing of p53**

To study the role of p53 in the case of SC-1-induced apoptosis, the frequency of the mRNA by RT-PCR and the gene product was determined by Western-blot analysis after induction. In this case, a considerable increase of the mRNA concentration

was found. On the protein plane, however, a constant and not significantly altered high concentration of the p53 gene product was found (Figure 12a).

The DNA-sequence of p53 in cell line 23132 was determined by amplification of two p53 fragments of cDNA with specific primers, cloning of the PCR-fragments and sequencing of eight clones. All clones with insertions spanning Exon 8 showed a mutation in codon 273, which resulted in an amino acid exchange of arginine to histidine (Figure 12b). This is a dominant negative mutation, which frequently occurs in gastric adenocarcinomas.

#### **2.10 Expression of p21**

Protein p21 is a molecule that is associated with the expression of p53. A test of the expression of p21 in gastric carcinoma cell line 23132 after treatment with SC-1 yielded an increase after 5 minutes followed by a reduction after 60 minutes (Figure 13).

#### **2.11 Expression of CD55/DAF after Apoptosis is Induced**

The expression pattern of CD55/DAF was studied after apoptosis was induced by 50 µg/ml of SC-1 using immunohistochemical staining of cytospin preparations with antibody SC-1. While non-induced cells exhibit a slight membrane staining with antibody SC-1, cells that were induced with SC-1 showed intensive membrane staining 12 hours after apoptosis was induced. This indicates an increase of the CD55/DAF presentation on the cell surface after the antibody is bonded to the cells.

This membrane staining disappears after 48 hours, and a diffuse cytoplasmatic staining can be detected. This staining is also found with reduced intensity after 96 hours. The increase in the CD55/DAF expression was also found in a Western Blot analysis with membrane extracts of apoptotic cells after SC-1 induction. While CD55/DAF cannot be detected in non-induced cells, the CD55/DAF expression increases 1 hour to 6 hours after induction. After 24 hours, the expression of CD55/DAF decreases, but it is always still higher than in non-induced cells (Figure 14a).

### **2.12 Cleavage of Cytokeratin 18**

The degradation of apoptotic cells accompanies the proteolytic cleavage of cytokeratin 18. The cleavage of cytokeratin 18 in cell line 23132 after SC-1-induced apoptosis and in primary tumors of patients who had been treated with 20 mg of SC-1 for 48 hours before a tumor resection was studied. An M30 cyto death staining showed a small quantity of apoptotic cells without inducing apoptosis, while the number of apoptotic cells increased up to 96 hours.

### **2.13 Molecular Analysis of SC-1-Apoptosis**

Consistent with the immunohistochemical staining, the biochemical analysis showed an increase of the CD55/DAF molecule, followed by a slight reduction after 24 hours of incubation with SC-1 (Figure 14a). The cleavage of PARP was studied by Western Blot analysis with use of total cell extracts from SC-1-induced cells and murine anti-PARP antibodies. In five independent

experiments, no cleavage of PARP was found that would be detected by the occurrence of an 85 kD cleavage product (Lazebnik et al., Nature 371 (1994), 346-347) (Figure 14b).

To study changes in the cell cycle after apoptosis is induced, the expression of topoisomerase II $\alpha$  by Western Blot analysis was determined. Topoisomerase II $\alpha$  is a key enzyme in the cell cycle, which is involved in DNA replication (Watt and Hickson, Biochem. J. 303 (1994), 681-695). The reduced expression of topoisomerase II $\alpha$  according to SC-1-induced apoptosis therefore shows a cell cycle arrest for at least one portion of cells (Figure 14c).

Transcription factor c-myc is involved in various apoptotic processes and can induce an apoptosis by transfection in cells (Evan et al., Cell 69 (1992), 119-128). A study of the expression pattern of c-myc after SC-1-induced apoptosis showed an increased expression 15 minutes after apoptosis was induced followed by a reduction after 4 hours (Figure 14d).

#### **2.14 Action of a Reduction of the Extracellular and Intracellular Calcium Concentration in Apoptosis**

It was examined whether Ca<sup>2+</sup> ions from the cell culture medium are taken up or are released from intracellular Ca<sup>2+</sup> reservoirs. To determine whether Ca<sup>2+</sup> is taken up from the culture medium, the cells were incubated for 24 hours in serum-free and Ca<sup>2+</sup>-free DMEM medium. Then, purified SC-1-antibody was added at a final concentration of 40  $\mu$ g/ml and incubated for another 24 hours. The cells were then fixed in 3% glutaric

aldehyde and studied in a rotated light microscope. Compared to control cells (not induced with SC-1), SC-1-induced cells showed morphological changes characteristic of an apoptosis and comparable with cells that would have been incubated with SC-1 in RPMI medium with the addition of 10% FCS.

The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  reservoirs was studied by incubation of cells (cultivated in serum-free DMEM medium) for 5 hours with 50  $\mu\text{M}$  of the cell-permeable chelating agent BAPTA (Alexis Biochemicals, Grünberg, Germany). The cells were incubated for 24 hours with 40  $\mu\text{g/ml}$  of purified SC-1. No detectable changes could be observed in the cell morphology, which indicates that no apoptosis was induced. An inhibition of the apoptosis produced by BAPTA could also be found by ELISA.

#### 2.15 Detection of Apoptosis in Primary Tumors

The administration of antibody SC-1 to patients with stomach cancer resulted in a clearly detectable tumor-cell-specific apoptosis, as was detected by in-situ nucleus staining (Figure 16). While no apoptosis (Figure 17a) or the presence of an intact tumor without regression (Figure 17c) was found in tumor biopsies that were taken before SC-1 was administered, the primary tumor showed strong apoptosis (Figure 17b) or a strong regression (Figure 17d) after SC-1 was administered.

### Claims

1. Glycoprotein that comprises at least one section of the amino acid primary structure of CD55 and a tumor-specific glycostructure.
2. Glycoprotein according to claim 1, characterized in that the glycostructure reacts with monoclonal antibody SC-1.
3. Glycoprotein according to claim 1 or 2, wherein in SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis, it exhibits an apparent molecular weight of 82 kD.
4. Process for obtaining a glycoprotein according to one of claims 1 to 3, wherein membrane preparations are produced from cells of the human adenocarcinoma cell line 23132, and the glycoprotein is obtained therefrom by size-exclusion and/or anion-exchange chromatography.
5. Use of a glycoprotein according to one of claims 1 to 3 in a test process in which the ability of a substance to bind to the glycoprotein is determined.
6. Use according to claim 5, wherein the ability to bind to the glycostructure is determined.
7. Use according to claim 5 or 6, wherein the ability of the tested substance to induce apoptosis, especially in tumor cells, is determined.
8. Use according to one of claims 5 to 7, wherein the ability of the tested substance to induce a phosphorylation cascade that is mediated by glycoprotein CD55 is determined.
9. Use according to claims 5 to 8, wherein the glycoprotein is used in isolated form, as a cell extract, especially as a

membrane preparation or in the form of complete cells, especially of human adenocarcinoma cell line 23132.

10. Use according to one of claims 5 to 9 for identifying substances that bind specifically to tumor cells.

11. Use according to claim 10 for identifying agents for tumor diagnosis and/or tumor therapy.

12. Use according to one of claims 5 to 11, wherein the pharmacologically compatible substances are tested.

13. Use according to claim 12, wherein the tested substances are selected from peptides, peptide mimetic agents, antibodies, antibody fragments and antibody derivatives.

14. Use of substances that bind specifically to a glycoprotein according to one of claims 1 to 3, with the exception of the monoclonal antibody SC-1, for the production of agents that induce apoptosis.

15. Use of substances that bind specifically to a glycoprotein according to one of claims 1 to 3, with the exception of monoclonal antibody SC-1, for the production of anti-tumor agents.

16. Use of substances that bind specifically to a glycoprotein according to one of claims 1 to 3, with the exception of monoclonal antibody SC-1, for the production of agents for tumor diagnosis.

17. Process for the preparation of the agents that induce apoptosis, wherein a potentially active substance is tested on its ability for specific binding to a glycoprotein according to one of claims 1 to 3 and in the case of a positive test result,

the substance is converted into a form for dispensing that is suitable for pharmaceutical applications optionally together with commonly used adjuvants, additives and vehicles.

18. Process for the preparation of anti-tumor agents, wherein a potentially active substance is tested on its ability for specific binding to a glycoprotein according to one of claims 1 to 3 and in the case of a positive test result, the substance is converted into a form for dispensing that is suitable for pharmaceutical applications optionally together with commonly used adjuvants, additives and vehicles.

19. Process for combatting tumors, wherein an anti-tumor-action quantity of a substance that can bind specifically to a glycoprotein according to one of claims 1 to 3, with the exception of monoclonal antibody SC-1, is administered to a patient.

20. Process for diagnosis of tumors, wherein a sample that is to be tested or a patient who is to be tested is brought into contact with a substance that can bind specifically to a glycoprotein according to one of claims 1 to 3, and the presence, the localization and/or the quantity of the glycoprotein in the sample or in the patient is detected.

21. Use of substances that specifically bind a glycoprotein according to one of claims 1 to 3 to trigger a phosphorylation cascade in tumor cells.

22. Use of substances that bind specifically to a glycoprotein according to one of claims 1 to 3 for transient



increase of the CD55/DAF presentation in membranes of tumor cells.

23. Use of substances that specifically bind a glycoprotein according to one of claims 1 to 3 for inducing apoptotic processes that do not comprise any cleavage of poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP).

24. Use of substances that specifically bind a glycoprotein according to one of claims 1 to 3 for inducing a cell cycle arrest in tumor cells.

25. Use of substances that bind specifically to a glycoprotein according to one of claims 1 to 3 for inducing apoptosis in dormant tumor cells.

26. Use according to one of claims 21 to 25, wherein the specifically bindable substance comprises antibody SC-1.

27. Use according to one of claims 21 to 26, wherein the substances are used in the form of conjugates with labeling or effector groups.

28. Use according to one of claims 21 to 27, wherein the substances have multiple binding sites for a glycoprotein according to one of claims 1 to 3.

29. Use according to claim 28, wherein the specifically bindable substances are cross-linked.

**Abstract**

The invention relates to a substance and a process for obtaining anti-tumor agents.

VO/ANM20047PWO December 21, 1999

Figure 1

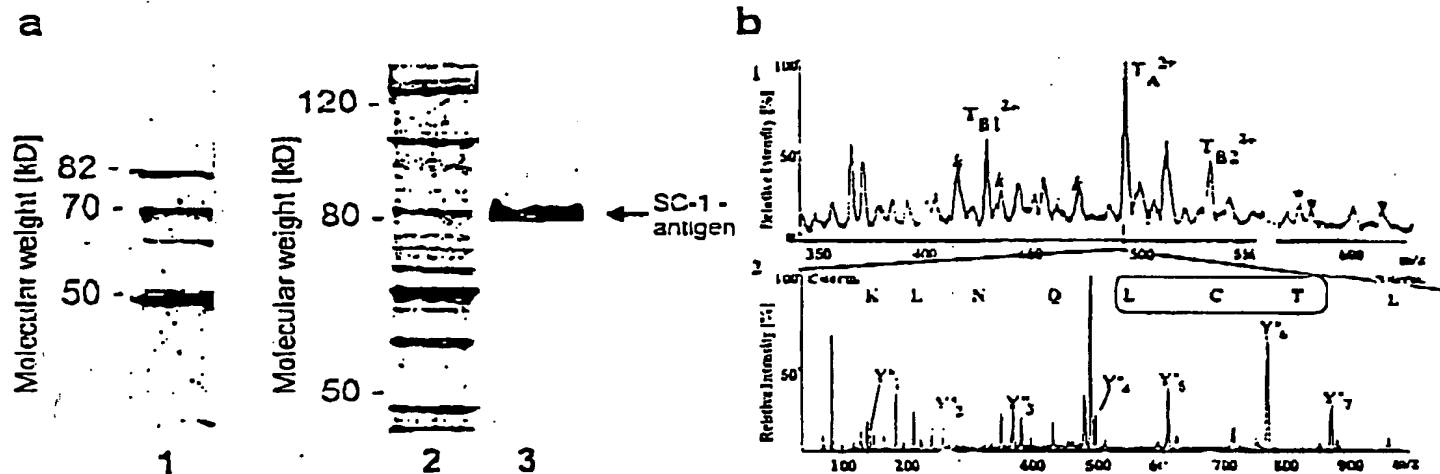


Figure 2

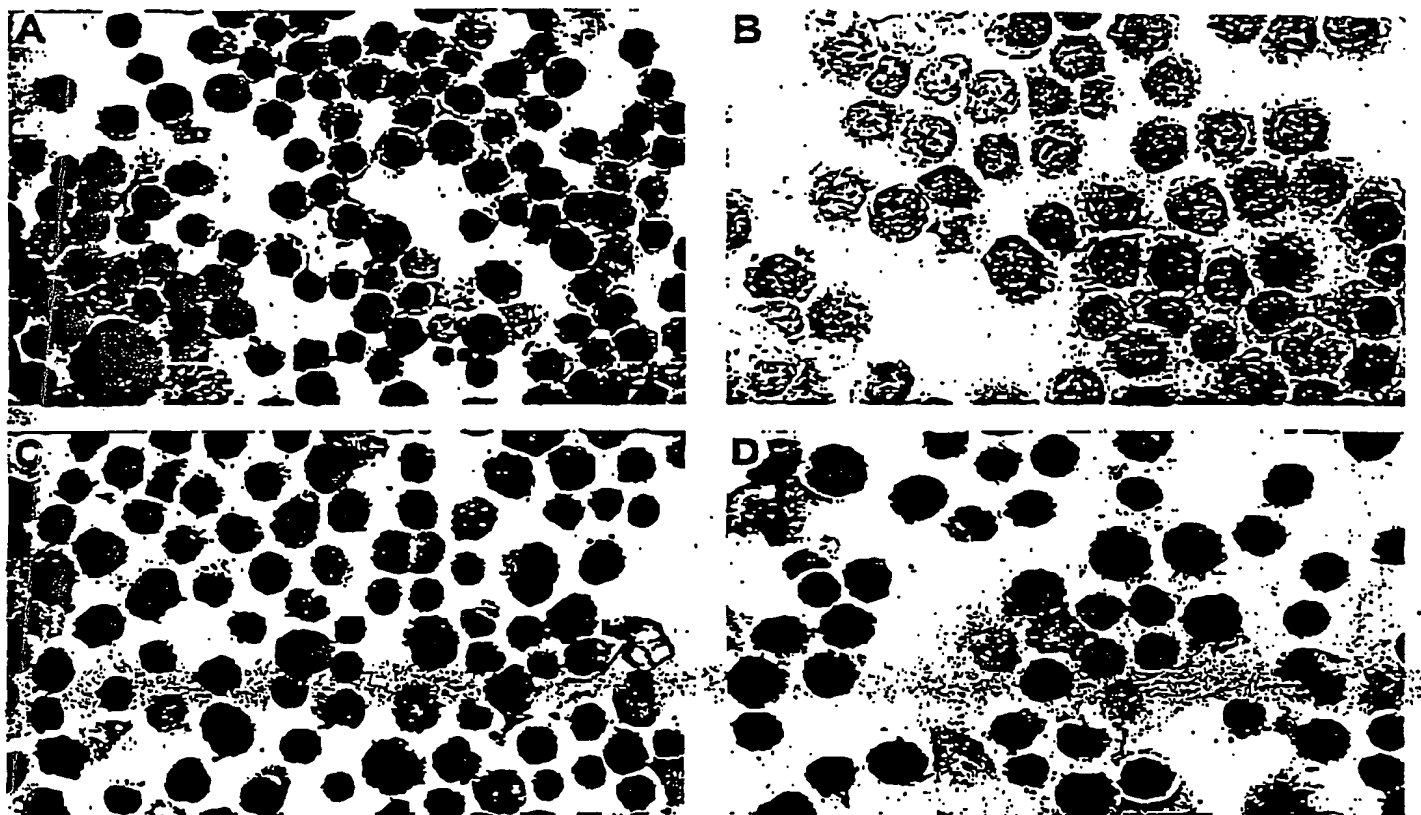
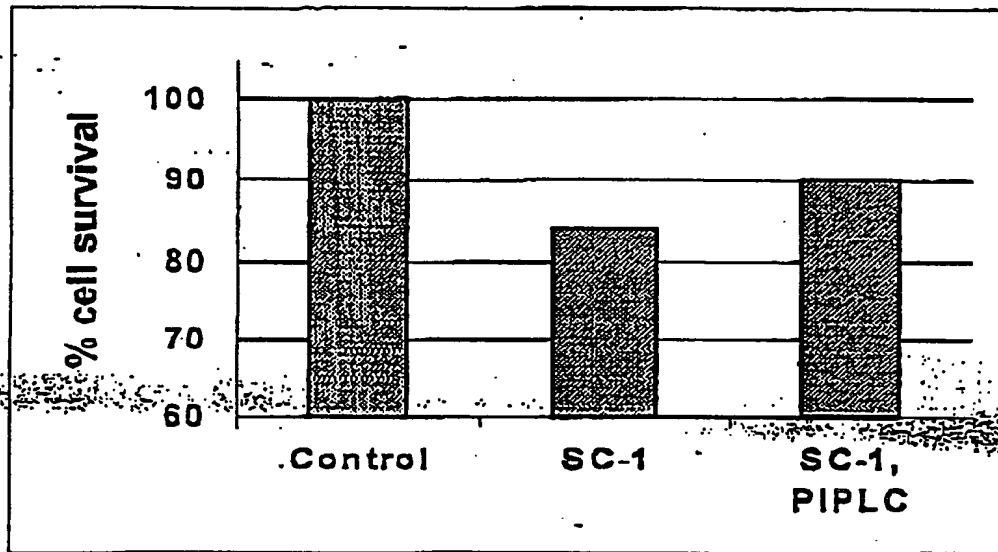


Figure 3



Phospholipase

Figure 4

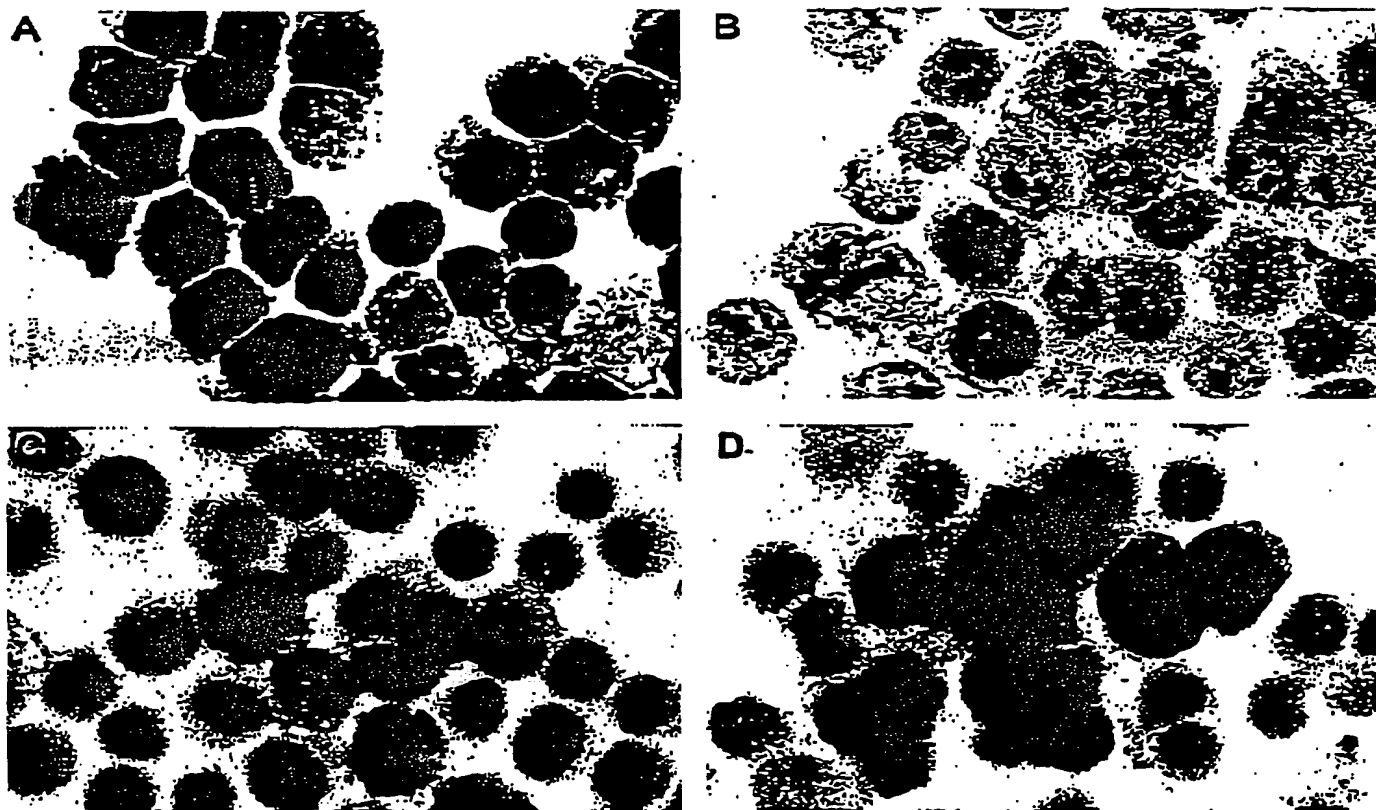


Figure 5

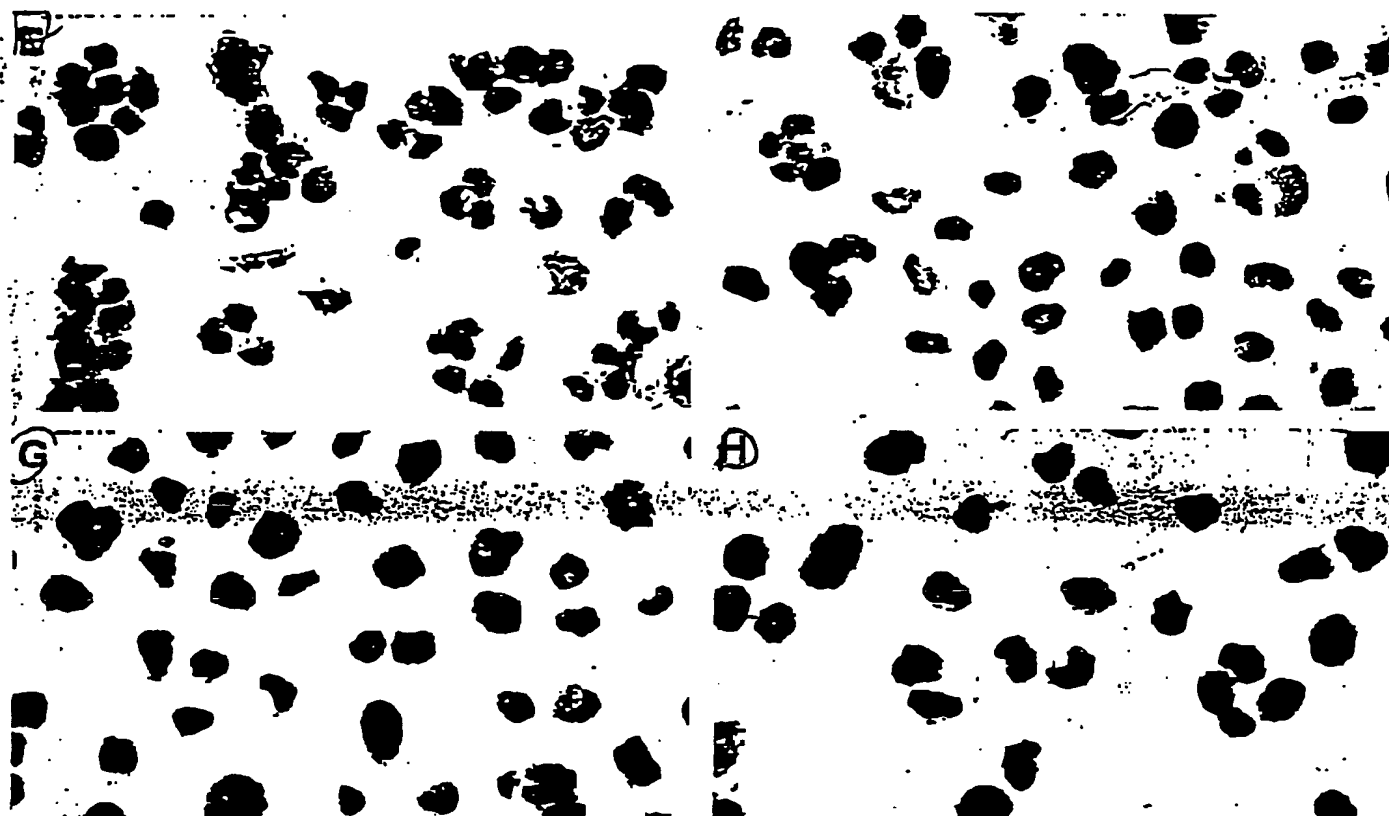


Figure 6

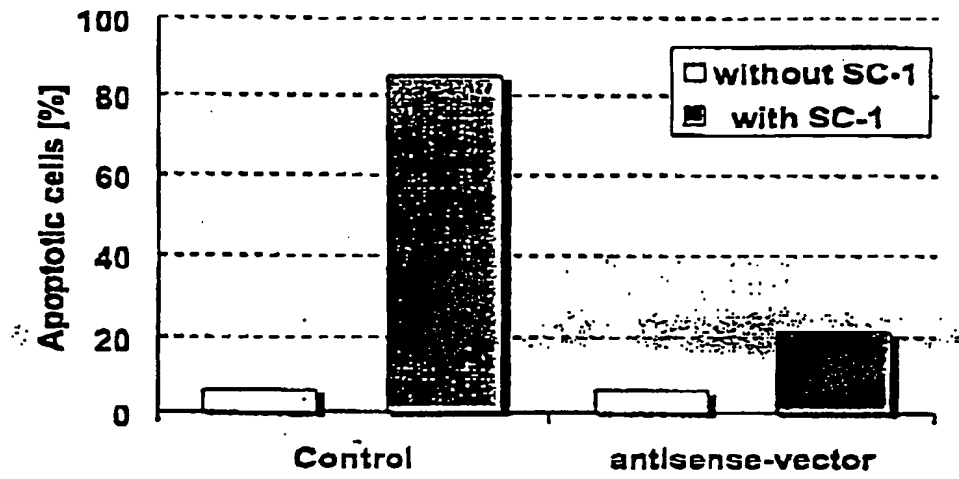




Figure 7

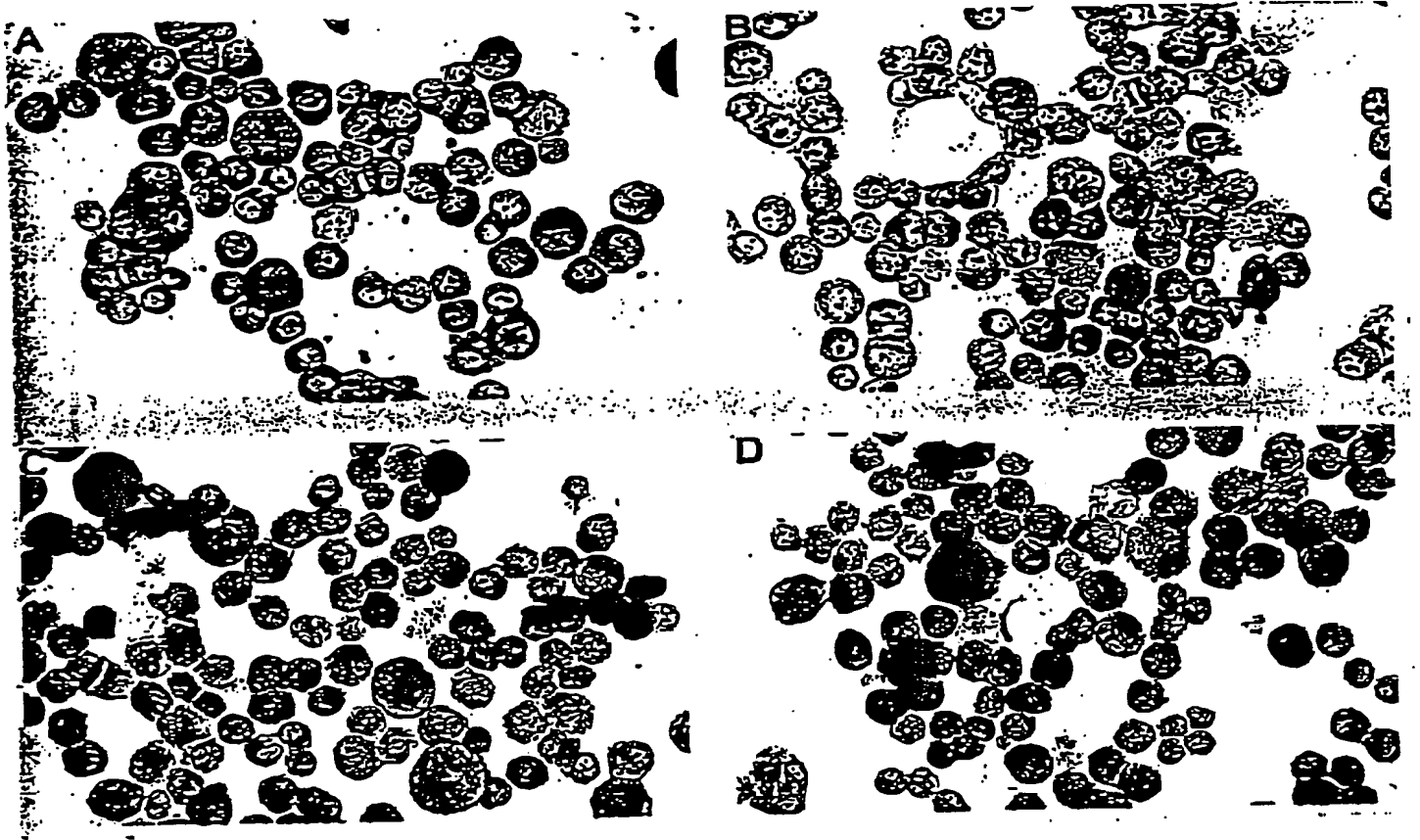
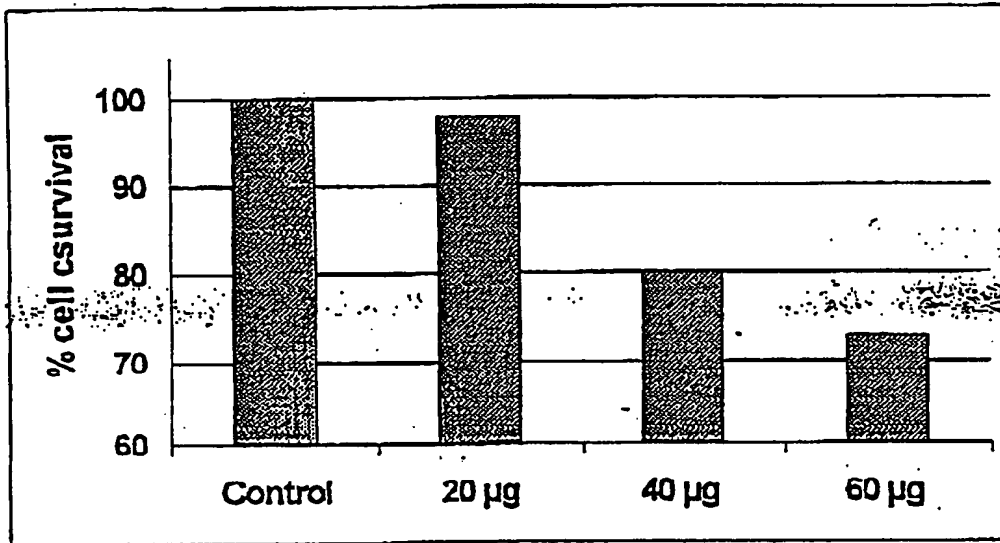
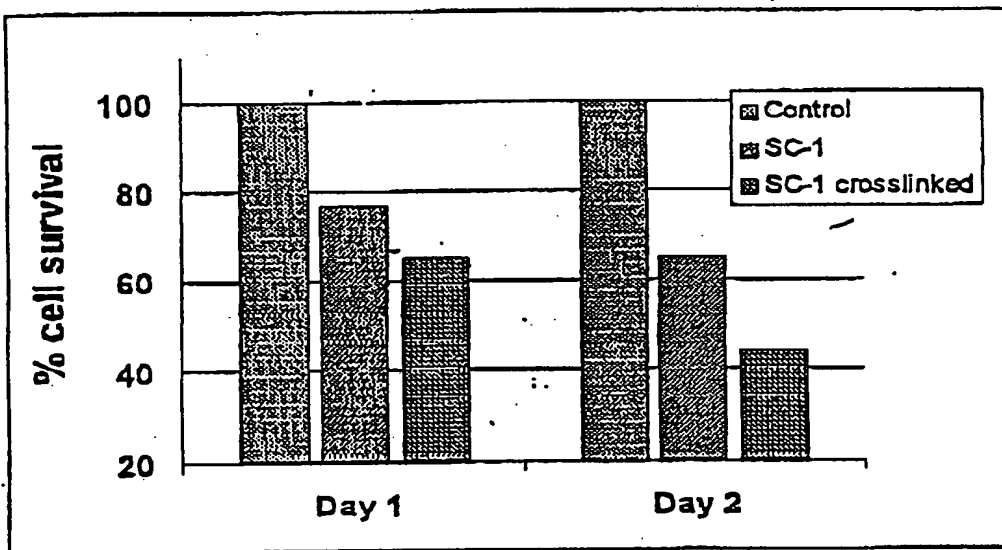


Figure 8

**A**

Verdünnungsreihe

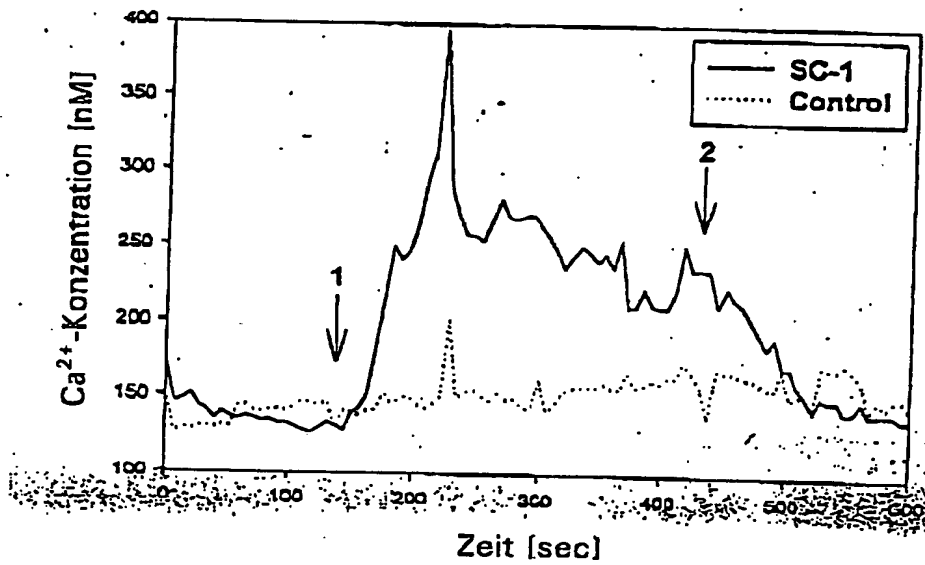
**B**

Crosslinking

[Key:]

Verdünnungsreihe = dilution series

Figure 9

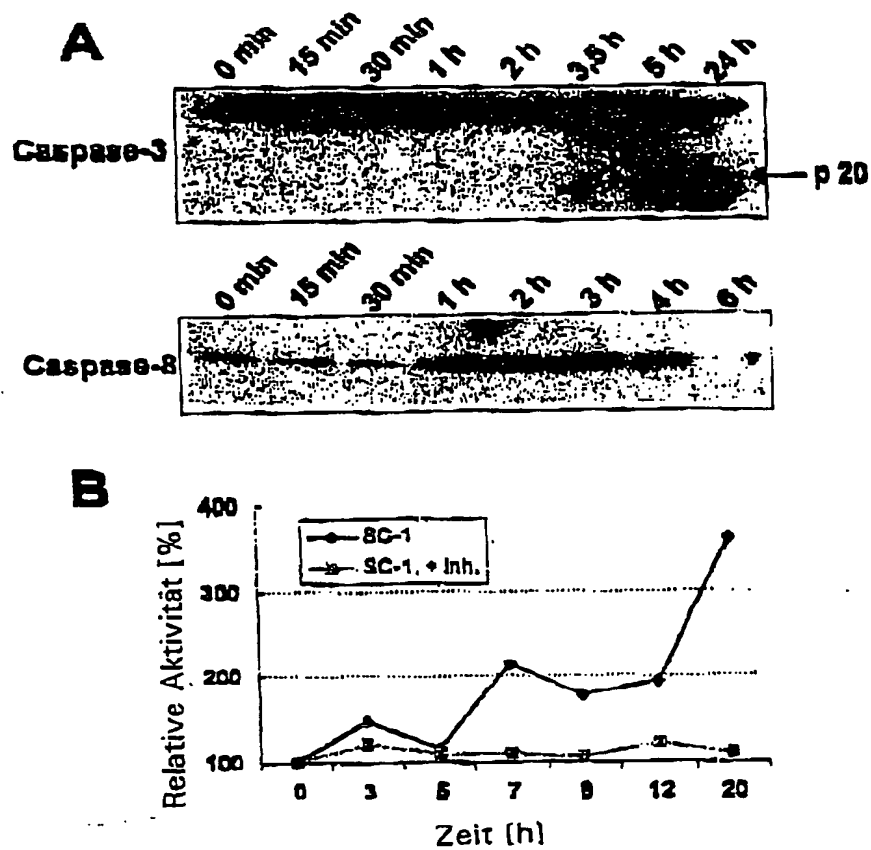


[Key:]

$\text{Ca}^{2+}$  konzentration [nM] =  $\text{Ca}^{2+}$  concentration [nM]

Zeit [sec] = Time [sec]

Figure 10



[Key:]

Relative Aktivität [%] = relative activity [%]

Zeit [h] = Time [h]

Figure 11

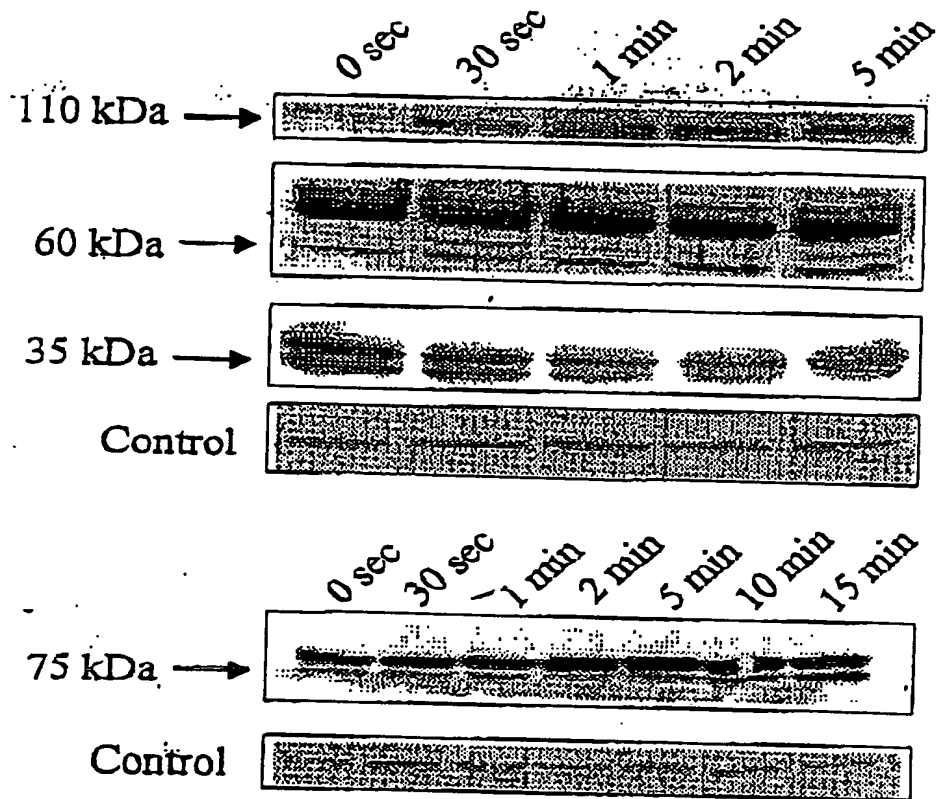
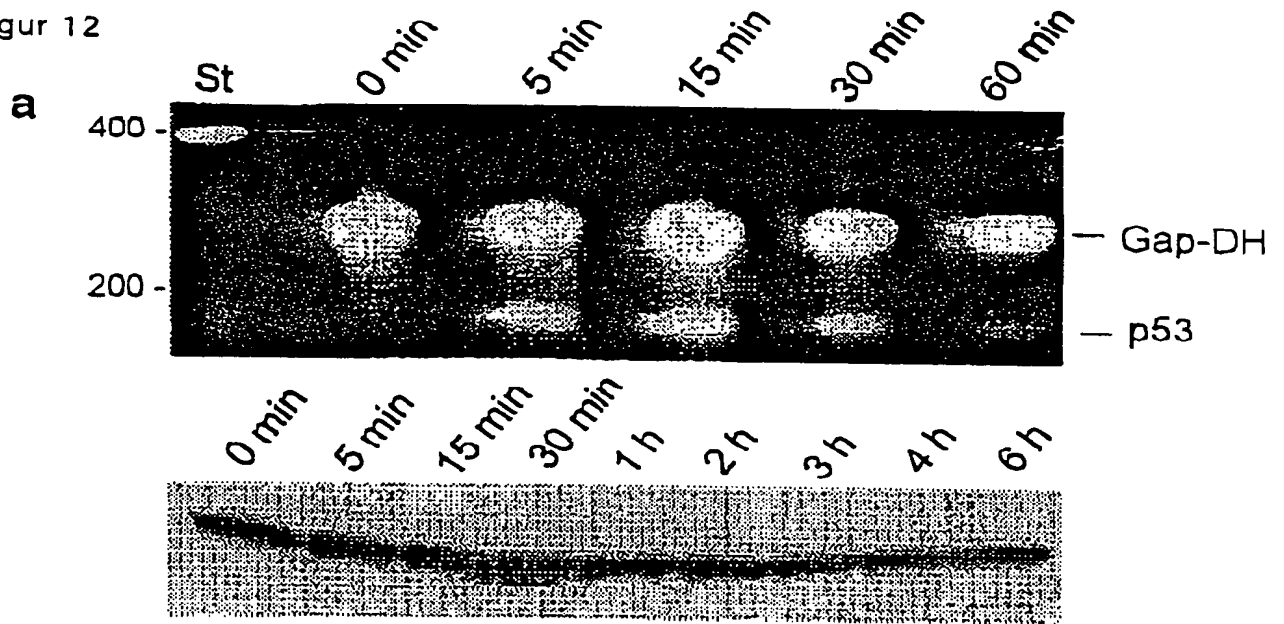


Figure 12

Figur 12

**b**

Codon-Nr.	265										270					275			
	S	G	N	L	L	G	R	N	S	F	E	V	R	V	C	A	C		
WT	AGT	GGT	AAT	CTA	CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	TGT	GCC	TGT		
23132	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		

K

Figure 13

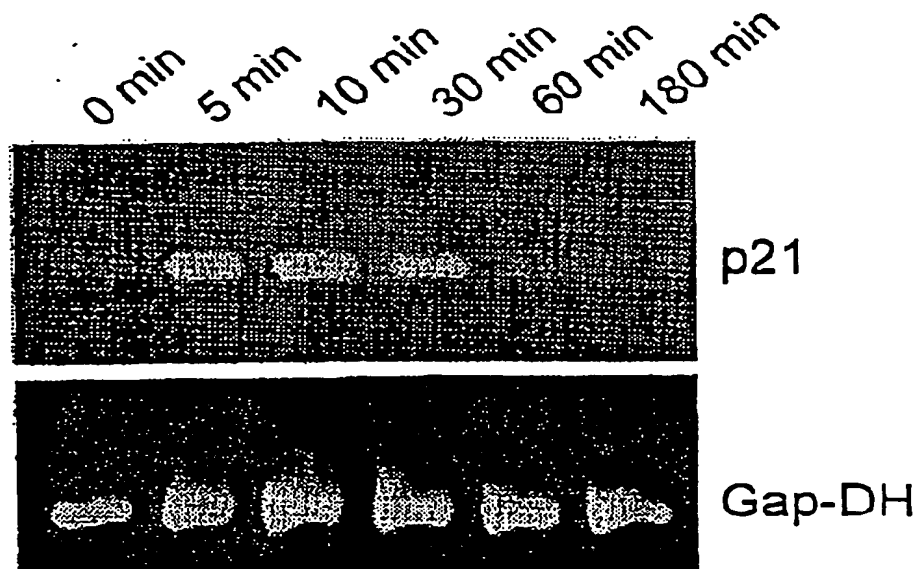


Figure 13

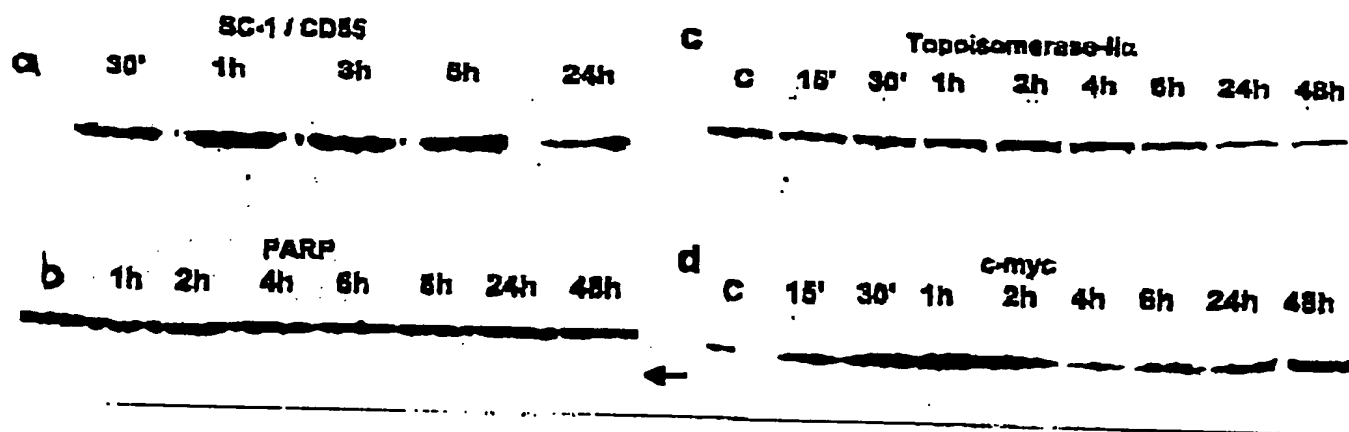


Figure 14

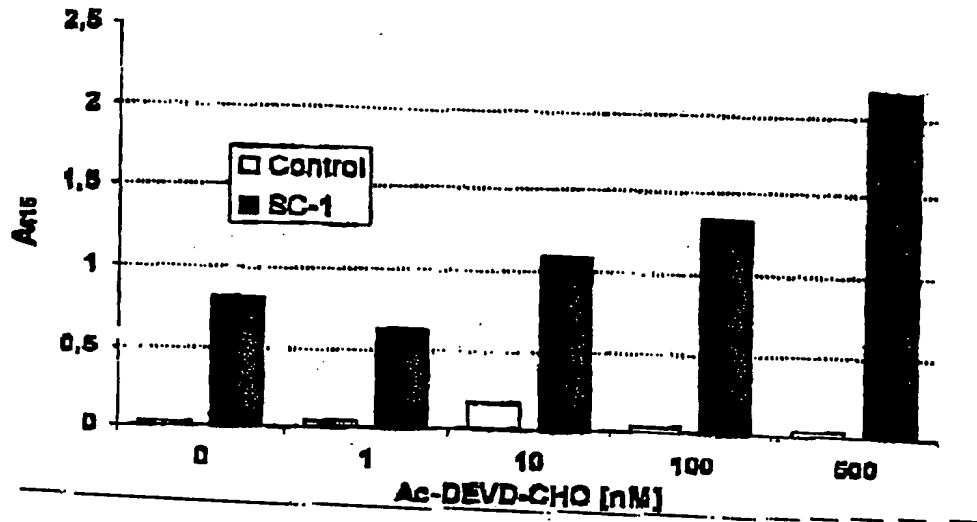




Figure 15



Figure 16

